



**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**"PEDRO RUIZ GALLO"**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**

**"Caracterización de bacterias endófitas  
diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L.,  
en Lambayeque, marzo-mayo de 2014"**

# **TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Carlos Humberto Altamirano Mego  
Br. Victor Raúl Plasencia Ruiz**

**LAMBAYEQUE - PERÚ  
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA**  
**Y PARASITOLOGÍA**



**“Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN**  
**BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Carlos Humberto Altamirano Mego**

**Br. Victor Raúl Plasencia Ruíz**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

**“Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014”**

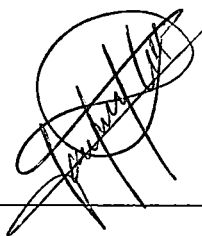
## **TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

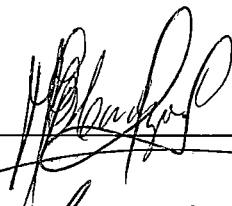
Dr. Luis Chicoma Chaqui

**PRESIDENTE**

  
A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'L' and 'C' followed by 'Chaqui', written over a horizontal line.

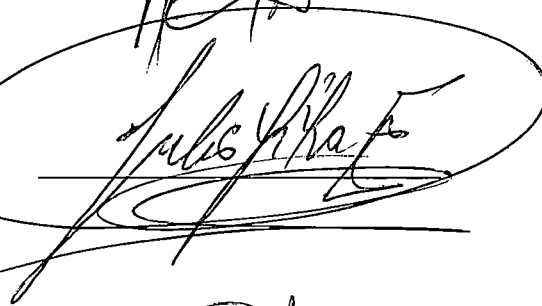
Dra. Marlene Cardozo Quinteros

**SECRETARIO**

  
A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Marlene Cardozo', written over a horizontal line.

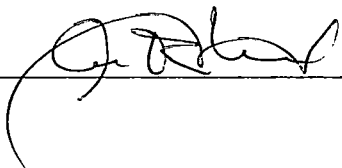
Lic. Julio César Silva Estela

**VOCAL**

  
A large, stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

  
A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

## **DEDICATORIA**

*Dedico esta Tesis a Dios y a mis padres Huile Altamirano Sigueñas y Dona Mego Pérez que siempre me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para llegar a ser un profesional de la Patria.*

*A mis hermanos y demás familia en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera Universitaria.*

**Carlos H. Altamirano Mego**

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente agradezco a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron su conocimiento y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mi Asesor de Tesis Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Y para finalizar, también agradezco a todos mis compañeros de clase durante todos los niveles de Universidad ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

***Carlos H. Altamirano Mego***

## DEDICATORIA

*Esta tesis se la dedicó a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Y con todo mi amor y cariño para mis padres, quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de mi vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos de mi vida.*

**Victor Raúl Plasencia Ruiz**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco en primer lugar a Dios quien me dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo. Por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión y hacer de mí persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años.

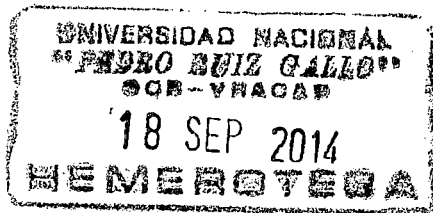
Agradezco a mis hermanos y hermanas por apoyarme en aquellas etapas de necesidad y además por llenar mi vida de grandes momentos que hemos compartido.

Agradezco de manera especial a nuestra profesora y a la vez patrocinadora Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudaron a formarme como persona e investigador; quién con sus conocimientos y apoyo supo guiar el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

También agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación.

A mis amigos por todos los momentos que pasamos juntos, por estar en las buenas y en las malas, en las alegrías y tristezas, pero sobre todo porque hayan sido como mis propios hermanos.

***Victor Raúl Plasencia Ruiz***



## Índice

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II.  | ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....  | 3  |
|      | 2.1 Antecedente de la investigación.....   | 3  |
|      | 2.2 Base teórica .....   | 7  |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 13 |
|      | 3.1 Materiales .....   | 13 |
|      | 3.1.1 Población y muestra .....  | 13 |
|      | 3.2 Métodos .....  | 13 |
|      | 3.2.1 Variables en estudio .....   | 13 |
|      | 3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....                                   | 13 |
|      | 3.2.3 Lugar de muestreo .....  | 13 |
|      | 3.2.4 Obtención de muestras de raíces .....  | 14 |
|      | 3.2.5 Aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas .....   | 14 |
|      | 3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias endófitas fijadoras de<br>Nitrógeno .....               | 32 |
|      | 3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de bacterias. ....   | 32 |
|      | 3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> .....                                       | 40 |
|      | 3.2.9 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno .....  | 40 |
|      | 3.2.10 Identificación del gen <i>nifH</i> en bacterias endófitas aisladas de<br>raíces de maíz ..... | 40 |
|      | 3.2.11 Análisis de los datos.....  | 44 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
| IV.   | RESULTADOS.....   | 48  |
| 4.1   | Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de maíz.....      | 48  |
| 4.2   | Características fenotípicas de bacterias endófitas diazotróficas.....           | 53  |
| 4.3   | Nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas nativas.....               | 63  |
| 4.4   | Gen <i>nifH</i> identificado con bacterias endófitas diazotróficas nativas..... | 63  |
| V.    | DISCUSIÓN.....  | 76  |
| VI.   | CONCLUSIONES.....   | 84  |
| VII.  | RECOMENDACIONES.....  | 85  |
| VIII. | RESUMEN.....  | 86  |
| IX.   | REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....   | 87  |
| X.    | ANEXOS.....   | 100 |

## Índice de tablas

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabla 1.</b>  | Posición de los campos comerciales de <i>Zea mays</i> L. en Reque donde se realizó el muestreo de raíces durante marzo-mayo de 2014..... | 16 |
| <b>Tabla 2.</b>  | Análisis físico- químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de <i>Zea mays</i> L. en Reque, Lambayeque, 2014.....              | 19 |
| <b>Tabla 3.</b>  | Características diferenciales de las especies de <i>Azospirillum</i> spp.....  | 37 |
| <b>Tabla 4.</b>  | Características diferenciales de <i>Herbaspirillum</i> spp.....  | 38 |
| <b>Tabla 5.</b>  | Características diferenciales de <i>Gluconoacetobacter</i> spp.....  | 38 |
| <b>Tabla 6.</b>  | Características diferenciales de <i>Burkholderia</i> spp.....  | 39 |
| <b>Tabla 7.</b>  | Características macroscópicas de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Zea mays</i> L., en Lambayeque, 2014.....   | 60 |
| <b>Tabla 8.</b>  | Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azospirillum</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....                   | 70 |
| <b>Tabla 9.</b>  | Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por <i>Azospirillum</i> spp. aisladas de raíces de <i>Zea mays</i> L.....      | 71 |
| <b>Tabla 10.</b> | Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Herbaspirillum</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....                 | 73 |

**Tabla 11.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L..... 73

**Tabla 12.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Gluconacetobacter* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días..... 74

**Tabla 13.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Gluconacetobacter* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L..... 74

**Tabla 14.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Burkholderia* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días..... 75

**Tabla 15.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L..... 75

## Índice de figuras

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. Enero, 2014.....                             | 15 |
| <b>Figura 2.</b>  | Ubicación de los campos comerciales de <i>Zea mays</i> L. en Reque, donde se realizó el muestreo de raíces de durante marzo – mayo de 2014..... | 17 |
| <b>Figura 3.</b>  | Cultivos de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en floración.....   | 18 |
| <b>Figura 4.</b>  | Extracción de raíces de <i>Zea mays</i> L.....  | 18 |
| <b>Figura 5.</b>  | Muestra de raíces de <i>Zea mays</i> L.....   | 19 |
| <b>Figura 6.</b>  | Lavado de raíces de <i>Zea mays</i> L. con agua potable.....  | 20 |
| <b>Figura 7.</b>  | Selección de raíces laterales engrosadas.....   | 20 |
| <b>Figura 8.</b>  | Corte de raíces de <i>Zea mays</i> L.....   | 21 |
| <b>Figura 9.</b>  | Frascos con fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L.....  | 21 |
| <b>Figura 10.</b> | Lavado de raíces de <i>Zea mays</i> L. con agua destilada más detergente neutro.....  | 23 |
| <b>Figura 11.</b> | Enjuague de raíces de <i>Zea mays</i> L. con agua destilada esterilizada.....   | 23 |
| <b>Figura 12.</b> | Lavado de raíces de <i>Zea mays</i> L. en solución tampón fosfato de potasio.....   | 24 |
| <b>Figura 13.</b> | Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L. en alcohol.....   | 24 |
| <b>Figura 14.</b> | Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L. en solución de hipoclorito de sodio - Tween 80.....                                     | 25 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 15.</b> | Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección.....                        | 25 |
| <b>Figura 16.</b> | Fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L. en papel secante esterilizado.....                             | 26 |
| <b>Figura 17.</b> | Fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L. desinfectados....  | 26 |
| <b>Figura 18.</b> | Macerado de raíces de fragmentos de <i>Zea mays</i> L.....  | 27 |
| <b>Figura 19.</b> | Separación del macerado de raíces de <i>Zea mays</i> L.....   | 27 |
| <b>Figura 20.</b> | Toma de muestra de macerado de raíces de <i>Zea mays</i> L.....   | 28 |
| <b>Figura 21.</b> | Siembra de macerado de raíces en medio semisólido sin nitrógeno.....                                      | 28 |
| <b>Figura 22.</b> | Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias.....                                    | 29 |
| <b>Figura 23.</b> | Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.....  | 30 |
| <b>Figura 24.</b> | Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido..... | 31 |
| <b>Figura 25.</b> | Primer y segundo subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.....                  | 31 |
| <b>Figura 26.</b> | Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada .....                      | 33 |
| <b>Figura 27.</b> | Cultivos puros de <i>Azospirillum</i> spp. en agar nutritivo en medio sólido.....                         | 33 |
| <b>Figura 28.</b> | Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.....  | 34 |
| <b>Figura 29.</b> | Bacterias fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos..  | 34 |
| <b>Figura 30.</b> | Medio NFb semisólido con ácido málico para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp.....              | 35 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 31.</b> | Medio NFB semisólido con glucosa para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp.....     | 35 |
| <b>Figura 32.</b> | Medio NFb semisólido con manitol para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp.....     | 36 |
| <b>Figura 33.</b> | Medio NFb semisólido con sacarosa para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp.....    | 36 |
| <b>Figura 34.</b> | Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.....                         | 39 |
| <b>Figura 35.</b> | Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> por bacterias..... | 41 |
| <b>Figura 36.</b> | Adición de KCl al caldo extracto de suelo.....  | 42 |
| <b>Figura 37.</b> | Centrifugación del caldo extracto de suelo mesclado con KCl.....                            | 42 |
| <b>Figura 38.</b> | Lectura de la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.....                          | 43 |
| <b>Figura 39.</b> | Bacterias representativas de cada género identificado para la extracción de ADN.....        | 45 |
| <b>Figura 40.</b> | Selección de una colonia bacteriana representativa.....                                     | 45 |
| <b>Figura 41.</b> | Suspensión de colonia bacteriana en un Eppendorf con agua biodestilada.....                 | 46 |
| <b>Figura 42.</b> | Calentamiento de bacterias en baño maría.....   | 46 |
| <b>Figura 43.</b> | Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.....                      | 47 |

**Figura 44.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI b), LGI-P (c), JNFb (d), JMV (e)..... 49

**Figura 45.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio NFb..... 50

**Figura 46.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014..... 50

**Figura 47.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio LGI..... 51

**Figura 48.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2014..... 51

**Figura 49.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio LGI-P..... 52

**Figura 50.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014..... 52

**Figura 51.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio JNFb..... 54

**Figura 52.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014..... 54

**Figura 53.** Película bacteriana por bacterias diazótrofes en medio JMV..... 55

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 54.</b> | Frecuencia de raíces de <i>Zea mays</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....               | 55 |
| <b>Figura 55.</b> | Frecuencia de raíces de <i>Zea mays</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.....                | 56 |
| <b>Figura 56.</b> | Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFb, LGI, LGI-P, JNFb, JMV.....  | 56 |
| <b>Figura 57.</b> | Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb.....  | 57 |
| <b>Figura 58.</b> | Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en LGI.....  | 57 |
| <b>Figura 59.</b> | Frecuencia de <i>Gluconacetobacter</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en LGI-P.....  | 58 |
| <b>Figura 60.</b> | Frecuencia de <i>Herbaspirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JNFb.....   | 58 |
| <b>Figura 61.</b> | Frecuencia <i>Burkholderia</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JMV.....   | 59 |
| <b>Figura 62.</b> | Frecuencia de <i>Azospirillum</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Herbaspirillum</i> y <i>Burkholderia</i> en raíces de <i>Zea mays</i> L., en Lambayeque, 2014..... | 59 |
| <b>Figura 63.</b> | Observación macroscópica de colonias de <i>Azospirillum</i> spp. en medio NFb sólido.....  | 61 |



|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 64.</b> | Observación macroscópica de colonias de <i>Herbaspirillum</i> spp. en medio JNFb sólido.....   | 62 |
| <b>Figura 65.</b> | Observación macroscópica de colonias de <i>Gluconacetobacter</i> spp. en medio LGI-P sólido.....   | 62 |
| <b>Figura 66.</b> | Obsrvacion macroscópica de <i>Burkholderia</i> spp. en medio JMV sólido.....   | 62 |
| <b>Figura 67.</b> | Frecuencia de especies de <i>Azospirillum</i> identificadas en raíces de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....   | 64 |
| <b>Figura 68.</b> | Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum lipoferum</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).....      | 64 |
| <b>Figura 69.</b> | Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum brasilense</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).....     | 65 |
| <b>Figura 70.</b> | Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum halopraeferens</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d)..... | 65 |
| <b>Figura 71.</b> | Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum</i> sp.1 fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).....           | 66 |
| <b>Figura 72.</b> | Crecimiento de <i>Azospirillum</i> spp. nativas en caldo con cloruro de sodio. ....  | 66 |

**Figura 73.** Prueba de hidrólisis de la urea por *Herbaspirillum* sp..... 67

**Figura 74.** Prueba de descarboxilación de lisina por *Burkholderia* sp..... 67

**Figura 75.** Resistencia de *Burkholderia* sp. a la polimixina B..... 68

**Figura 76.** Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio..... 68

**Figura 77.** Valores máximos (ppm) de nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014..... 69

## I. INTRODUCCION

El cultivo de *Zea mays* L. "maíz" tiene importancia económica a nivel mundial siendo el segundo del mundo con una producción de 863.42 millones de toneladas (USDA, 2013). En el Perú, el rendimiento promedio es  $4,515 \text{ tha}^{-1}$  (MINAG, 2013); sin embargo, como en otros países, depende fundamentalmente de la aplicación de insumos químicos, como los fertilizantes. En 1950 en el mundo se utilizaron 2,75 millones de toneladas de fertilizantes sintéticos y en el 2008 se consumieron 100 millones de toneladas. Debido a que su extracción depende de la energía de combustibles de origen fósil, no renovables, los precios se incrementan constantemente (Altieri y Nicholls, 2000).

Los fertilizantes representan 20 – 30% de los costos de producción de un cultivo y cuando son correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad; no obstante, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta, es en promedio 50% para el nitrógeno (SAGARPA, 2010). El resto se pierde por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión (Pedraza *et al.*, 2010; Salhia, 2010). Las emisiones liberadas hacia la atmósfera en las formas de amoníaco, óxidos nítrico y nitroso causan la lluvia ácida y destruyen la capa de ozono. A su vez, los nitratos lixiviados originan eutrofización de aguas superficiales y contaminan los mantos freáticos, generando enfermedades en los seres vivos (Aguado, 2012).

En la atmósfera terrestre se encuentra nitrógeno molecular en abundancia; sin embargo, los eucariotas no lo pueden utilizar. Solo un grupo de

procariotas reducen enzimáticamente el nitrógeno atmosférico a amoníaco, que puede ser incorporado para el crecimiento y mantenimiento de las células. Estos organismos son denominados diazótrofos y el proceso responsable de la incorporación de nitrógeno a la biomasa es la fijación de nitrógeno.

Las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las bacterias endófitas son aquellas que colonizan los tejidos vivos de las plantas, principalmente espacios intercelulares y dentro de los tejidos vasculares, sin causar algún efecto negativo inmediato o daño aparente (Pérez *et al.*, 2009). Diversas investigaciones en el cultivo de maíz, han revelado una significativa riqueza de bacterias endófitas que además de fijar nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen ácido indolacético, remueven contaminantes, suprimen fitopatógenos y promueven el crecimiento de las plantas (Loaces, 2011; Ji *et al.*, 2013; Mbai *et al.*, 2013). En Lambayeque no se han realizado estudios para aislar y caracterizar bacterias endófitas de raíces, como punto de partida para futuras investigaciones, en la obtención de un inoculante comercial.

El maíz amarillo duro es el tercer cultivo con importancia en el Perú. Los fertilizantes químicos representan 22,33% de los costos de producción (Zamudio y Vasquez, 2011); sin embargo, la oferta no satisface la demanda, requiriéndose importar el 60% (MINAGRI, 2012). Los cultivos de maíz serán favorecidos con la aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno, caracterizándas primero en laboratorio y luego en invernadero y campo, incrementándose el desarrollo vegetativo y rendimiento con prácticas amigables con el ambiente.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las características de las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L., maíz, en Lambayeque?. Para resolver este problema se planteó como objetivo general determinar las características de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de maíz. Los objetivos específicos fueron aislar bacterias endófitas diazotróficas, caracterizar fenotípicamente las bacterias, cuantificar el nitrógeno fijado e identificar el gen *nifH*. La hipótesis planteada fue Las bacterias endófitas aisladas de raíces de maíz son, microaerófilas, fijan nitrógeno *in vitro* y presentan el gen *nifH*.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Se estudió la diversidad genotípica de bacterias endófitas en maíz dulce (*Zea mays* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en una temporada de cultivo. Las bacterias se aislaron de tejidos de raíces y tallos y se identificaron mediante análisis de ácidos grasos totales, usando cromatografía de gas. El 70,5% de las bacterias endófitas y 27 de las 36 identificadas correspondieron a formas Gram negativas. Los géneros más frecuentes, en raíces y tallos fueron *Burkholderia pickettii*, *Enterobacter* spp. y *Bacillus megaterium*. A su vez, *B. gladioli*, *B. solanacearum* y *E. cloacae* se encontraron solo en raíz y *Methylobacterium* spp. con mayor frecuencia en tallos. En raíces de algodón se identificaron *Agrobacterium radiobacter*, *Serratia* spp. y *B. solanacearum* y en tallos *B. megaterium* y *B. pumilus*. Las bacterias endófitas presentes al inicio de la temporada de cultivo se aislaron también al final de la temporada y la diversidad de bacterias en maíz y algodón fue mayor en las raíces que en los tallos (McInroy y Kloepper, 1995).

La fijación biológica es una alternativa para disminuir el fertilizante sintético nitrogenado. Se realizó un estudio de la colonización endofítica y fijación de nitrógeno por *Herbaspirillum* sp. Las bacterias fueron aisladas de tallos de plantas de arroz cultivadas en invernadero. Éstos fueron esterilizados superficialmente con etanol 70% y luego fueron sembrados en medio semisólido Renrrie suplementado con extracto de arroz y malato (RMR). Después, los cultivos fueron reinoculados en medio semisólido y las películas

desarrolladas se cultivaron en agar sólido RMR. Las colonias obtenidas, nuevamente se sembraron en medio semisólido y a los 7 días se cuantificó la actividad N<sup>asa</sup>. Con base a la secuencia del ADN<sup>r</sup> 16S, las bacterias diazotróficas se relacionaron con *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Enterobacter* y *Azospirillum*. A vez, utilizando el gen *gfp*, que codifica para una proteína verde fluorescente, se determinó que *Herbaspirillum* sp. B501 colonizó los tallos, semillas y principalmente los espacios intercelulares de las hojas, así como también se detectó fijación de nitrógeno en hojas y tallos de plántulas de *Oryza officinalis* (Elbeltagy *et al.*, 2001).

Microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* presentan potencial para la fijación biológica del nitrógeno, FBN y producción de reguladores del crecimiento en diferentes cultivos agrícolas. En este contexto, se cuantificaron y aislaron bacterias diazotróficas de nueve cultivares de arroz irrigado. Utilizando los medios NFb (*Azospirillum brasilense*/ *lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*), JMV (*Burkholderia*), LGI (*Azospirillum amazonense*) y LGI-P (*Gluconacetobacter*), se obtuvieron 58 aislados. De éstos, diez obtenidos en el medio NFb, *A. brasilense* y *A. lipoferum* fueron evaluados. En la FBN, *A. brasilense* y *A. lipoferum* presentaron los mayores valores (41,08 y 46,8  $\mu\text{gN mL}^{-1}$ , respectivamente). En cuanto a la síntesis de ácido indolacético, el aislado I-31 fue el mayor productor (13,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se concluyó que bacterias diazotróficas endofíticas aisladas de cultivares de la región tienen potencial como inoculante para el cultivo de arroz (Vicentini, 2006).

La necesidad de estrategias sostenibles para la agricultura requiere el desarrollo de preparados microbianos que mejoren la nutrición de las plantas. Se realizó una investigación para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos de la rizósfera y semillas de *Lactuca sativa* L. "lechuga". Con el suelo rizosférico se realizaron diluciones y alícuotas se sembraron en medio extracto de levadura–manitol–agar rojo congo (EL-MARC), obteniéndose nueve cultivos de rizobios que fueron investigados en la prueba de nodulación en *Phaseolus vulgaris*, tolerancia de NaCl, crecimiento en G<sup>PA</sup> y producción de acidez o alcalinidad en el medio extracto de levadura–manitol– agar azul de bromotimol. Se obtuvieron tres grupos de rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*

y un tercer grupo no definido. De los potenciales rizobios, cinco disolvieron hidroxapatita. Por su parte, en los macerados de las semillas se observaron bacterias endófitas caracterizadas por su comportamiento microaerofílico y producción de ácido detectado por el viraje del indicador en el medio NFb (Peña y Reyes, 2007).

Se realizó un trabajo de investigación con el objeto de aislar y caracterizar bacterias diazótrofes en raíz y tallo de tres cultivos de maíz variedad PAU871, bajo tres condiciones de fertilización ( $0.40$  y  $80 \text{ KgNha}^{-1}$ ) en invernadero. Las muestras esterilizadas superficialmente con etanol 70% e hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) 4%, se maceraron, diluyeron, sembraron en medios semisólidos sin nitrógeno (JNFb, JMV, LGI) y posteriormente en medio TY. Se obtuvieron 167 colonias de bacilos Gram negativos. Utilizando el protocolo de PCR anidada y primers degenerados, se amplificó el gen *nifH*, en el 22% de las bacterias, en su mayoría provenientes de raíz con fertilización. Según las diferencias en el perfil de restricción del gen 16S rADN (ARDRA) se obtuvieron ocho grupos diferentes a los que se secuenció y determinó la filiación taxonómica, encontrando que los géneros más frecuentes, con 99% de homología correspondieron a *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Raoultella* y *Enterobacter* (Menezes, 2009).

La aplicación de las PGPR en el campo requiere estudios previos que garanticen su establecimiento y efectividad. Con este propósito se aisló *Azospirillum* sp. de raíces de maíz y plantas relacionadas. Las raíces se fragmentaron, se esterilizaron con etanol 70%, cloramina 1% y se enjuagaron con agua destilada. Después, se sembraron en medio de cultivo semigelificado y las bacterias se aislaron en medio sólido. La caracterización de *Azospirillum* sp. se hizo con base a la morfología colonial y microscópica y la selección por la actividad de la enzima N'asa, mediante la reducción de acetileno. El valor máximo de la N'asa fue  $281,5 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . Las bacterias con los mayores valores se inocularon en plántulas de 13 días en hidroponía, determinándose la mayor infección (91%) en la zona basal de la raíz, disminuyendo con la profundidad radicular media (86%) y apical (84%). Se concluyó que la dinámica poblacional de *Azospirillum* spp. estuvo relacionada

con la concentración de oxígeno y nitrógeno en el sustrato hidropónico (Rangel *et al.*, 2011).

Las bacterias del género *Herbaspirillum* endófitas fijan nitrógeno, producen fitohormonas y promueven el crecimiento vegetal. Se realizó una investigación para caracterizar y seleccionar estas bacterias en el cultivo de arroz. Se colectaron 20 plantas en estado vegetativo y al inicio de floración. Las hojas y tallos se desinfectaron, se maceraron y posteriormente se realizaron diluciones seriadas. A continuación, se inocularon frascos con medios de cultivo JNfb semisólido, se incubaron a 35°C por 4 - 7 días y se investigó la formación de una película bajo la superficie. Después de un subcultivo en este mismo medio, las bacterias se aislaron en medio sólido JNfb con extracto de levadura y en medio Batata. Se obtuvieron 113 aislados, identificándose el 9,73% preliminarmente como *Herbaspirillum* spp. La cepa 4.2 incrementó significativamente la biomasa aérea de plantas de arroz en invernadero. La secuenciación del gen ARNr 16S confirmó esta bacteria como *Herbaspirillum*, concluyéndose que tiene potencial como biofertilizante (Punschke y Mayans, 2011).

La capacidad de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* de fijar nitrógeno y proporcionar a la caña de azúcar cantidades significativas de nitrógeno, sin formación de nódulos evidencia su potencial para otras monocotiledóneas, como el maíz. Se realizó una investigación para determinar la correlación entre el contenido de sacarosa en el maíz y la colonización de *G. diazotrophicus* y para determinar la eficiencia del tratamiento del suelo, inmersión de la raíz y los métodos asépticos de inoculación en condiciones de invernadero. La bacteria fue detectada en siete genotipos de maíz, con diferentes niveles de sacarosa, alcanzándose 93% en la eficiencia de inoculación aséptica. La colonización en genotipos de maíz no fue detectada utilizando el tratamiento del suelo e inmersión de la raíz. En la prueba de reducción de acetileno no se demostró actividad de la nitrogenasa en las bacterias aisladas (Eskin, 2012).

*Azotobacter* y *Azospirillum* son bacterias utilizadas como promotoras del crecimiento vegetal, debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y



producir hormonas de tipo indólico. Estas bacterias se aislaron de la rizósfera de cultivos de *Gossypium hirsutum* "algodón". Las poblaciones microbianas se caracterizaron fenotípicamente en los medios de cultivo semiespecíficos: Ashby y LG (*Azotobacter* sp.) y NFb, LGI y batata (*Azospirillum* sp.). La promoción de crecimiento vegetal se determinó mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, por la técnica de reducción de acetileno y producción de índoles por el método colorimétrico de Salkowsky. Se obtuvieron nueve aislados de *Azotobacter* sp. y cuatro de *Azospirillum* sp., observándose diferencias significativas en la actividad N'asa, con un rango de 19,87 - 460,60 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y en la producción de indol se alcanzó 20,08 ug mL<sup>-1</sup>. Por su eficiencia en la promoción de crecimiento vegetal se seleccionaron cinco bacterias para ser investigadas como principio activo en futuros inoculantes para el algodón (Guzmán *et al.*, 2012).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta, la cual favorece su crecimiento y desarrollo. En una investigación se aislaron 32 bacterias diazotróficas, en muestras de suelo rizosférico de diferentes cultivos y se identificaron con los medios de cultivos tradicionales y el sistema BBL CRYSTAL. Nueve aislados correspondieron a *Stenotrophomonas maltophilia* y uno a *Azotobacter vinelandii*. Después, se realizó un ensayo en invernadero para determinar el efecto fertilizante en plantas de maíz, con un diseño experimental de bloques al azar y nueve tratamientos, por triplicado: T1: *A. vinelandii* ATCC 9046; T2 a T7 para los seis aislados, T8 para fertilización química y T9 para suelo sin fertilización (testigo). Los aislados M8-10, M10-1 y M11-3 identificados como *S. maltophilia* incrementaron la emergencia de las plantas, considerándose con potencial biofertilizante (Moreno & Galvis, 2013).

## **2.2 Base teórica**

### **a. Fijación biológica de nitrógeno, FBN**

La disponibilidad del carbono y nitrógeno en los organismos vivos a partir del gas carbónico y el nitrógeno molecular del aire se da a través de la fotosíntesis y fijación biológica del nitrógeno. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) funciona en bacterias adaptadas en ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos; sin embargo, no todas poseen el sistema enzimático

responsable de la reducción del nitrógeno: la nitrogenasa. El nitrógeno es un constituyente fundamental de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, entre otros. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido. Los únicos seres vivos fijadores de nitrógeno o diazótrofos son Eubacterias y Archaeas. La atmósfera contiene en promedio  $10^{15}$  toneladas de gas  $N_2$ , y el ciclo del nitrógeno involucra la transformación de unas  $3 \times 10^9$  toneladas de  $N_2$  por año (Baldani *et al.*, 2000).

Todos los microorganismos reductores de nitrógeno presentan actividad del complejo enzimático nitrogenasa, constituido por dos componentes o metaloproteínas. El componente II o dinitrogenasa reductasa es un dímero de 68 000 Da, formado por dos subunidades idénticas unidas por un grupo prostético de 4Fe-4S, codificado por el gen *nifH* y su función es transportar los electrones desde el donador ferredoxina o flavodoxina hacia la proteína I. A su vez, el componente I o dinitrogenasa es un tetrámero de 220 000 Da, formado por dos subunidades, codificado por los genes *nifDK*. Esta proteína tienen los cofactores hierro y molibdeno (FeMo-Co) y es encargada de ceder los electrones al sustrato (Elmerich, 2012). También se han aislado “nitrogenasas alternativas” que no dependen del Mo, si de Va y otros que solo dependen de Fe (Freoni, 2006).

Según su localización las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las bacterias rizosféricas son de vida libre y ejercen su efecto desde afuera de la planta, habitando la superficie de las raíces o el suelo rizosférico; aunque bajo ciertas circunstancias, pueden ocupar espacios intracelulares superficiales de las plantas. A su vez, el término endófito según Kloepper *et al.* (1992) hace referencia a los microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas. En Agronomía, este concepto involucra todos los microorganismos que pueden ser aislados de plantas, cuyos tejidos fueron esterilizados superficialmente y que no causan una enfermedad visible en su planta hospedadora (Loaces, 2011). Según su estrategia de vida, las bacterias endófitas pueden ser obligadas y facultativas. Las obligadas dependen del hospedero para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión, mientras que las facultativas cumplen una etapa de su ciclo fuera del hospedero, generalmente en el suelo (Beracochea, 2011).

Los endófitos pueden ser pasajeros, oportunistas y competentes. En el primer caso, pueden llegar a ser endófitos por casualidad, por ejemplo, a través, de la colonización de heridas o después de la invasión de las raíces por nemátodos. Con frecuencia se limitan al tejido cortical de la raíz. Los endófitos oportunistas, muestran características particulares en la colonización de la raíz, por ejemplo, una respuesta quimiotáctica, que les permite colonizar el rizoplasma y después invadir los tejidos vegetales, a través de grietas formadas en los lugares de emergencia de las raíces laterales vegetales. Al igual que las endófitas pasajeras, se limitan al cortex radicular. Por su parte, los endófitos competentes, poseen todas las propiedades de los endófitos oportunistas y además la maquinaria genética necesaria para colonizar, por lo que invaden los tejidos vasculares, extendiéndose por toda la planta y mediante la manipulación del metabolismo de la planta, mantienen un equilibrio armonioso con el hospedero, incluso cuando están presentes en alta densidad (Loaces, 2011).

En el suelo rizosférico se encuentra la mayor fuente de bacterias endófitas y generalmente es donde comienza el proceso de colonización. Es posible que sea pasiva, cuando las bacterias se encuentran en las semillas y en las plantas que se propagan vegetativamente, pasan de un lugar a otro con las yemas. La transmisión de las bacterias endófitas obligadas es en forma vertical o vía vectores. La colonización activa involucra tres pasos. El primero es el acercamiento espacial de la bacteria a la superficie de la raíz, a través del movimiento por quimiotaxis. Luego que la bacteria entra en contacto con la raíz, se adhiere y se ancla en la superficie, multiplicándose y formando microcolonias. Desde este lugar comienza el segundo paso o invasión de los tejidos internos, penetrando por las aberturas naturales o por liberación de enzimas hidrolíticas. Una vez dentro, en el tercer paso, los endófitos se multiplican, colonizando los espacios intracelulares y pueden permanecer en un determinado sitio o realizar una colonización sistemática por el sistema vascular o el apoplasto (Beracochea, 2011).

### **b. El cultivo de *Zea mays* L. “maíz”**

El centro de origen del maíz comprende la región de Mesoamérica, localizada entre el centro y sur de México hasta América Central. Los restos arqueobotánicos descubiertos en las cuevas del valle de Tehuacán en Puebla, tiene una antigüedad de 4500-7000 años. Con base a estos restos y otros hallazgos, como cerámica y lítica, así como el estudio de sedimentos y depósitos de restos vegetales en contextos arqueológicos, se cree que el maíz fue domesticado hace aproximadamente 8000 años. Su evolución es producto de la interacción de los procesos biológicos y factores ecológicos con la dinámica cultural y los intereses del hombre. En la actualidad la mayor información sobre las razas de maíz se encuentra en la base de datos del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP (SAGARPA, 2008; Acosta, 2009).

El maíz y sus parientes silvestres, los teocintles, se clasifican en el género *Zea*, perteneciente a la familia Poaceae, que incluye también al trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar. Con base a los caracteres de la espiga o inflorescencia masculina, el género *Zea* se ha dividido en dos secciones. La sección Luxuriantes que agrupa cuatro especies: los teocintles perennes (*Z. diploperennis* y *Z. perennis*) y los anuales *Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*. La sección *Zea* se circunscribe a una sola especie (*Z. mays*). A su vez, ésta se divide en cuatro subespecies: el maíz (*Z. mays* ssp. *mays*) y los teocintles anuales *Z. mays* ssp. *mexicana*, *Z. mays* ssp. *parviglumis* y *Z. mays* ssp. *Huehuetenanguensis*. A excepción de *Z. nicaraguensis* y *Z. mays* ssp. *Huehuetenanguensis*, los teocintles son endémicos en México (SAGARPA, 2010).

El maíz es una planta de porte robusto y hábito anual. Las raíces primarias son fibrosas, presentando además raíces adventicias que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo; las hojas son largas, grandes, lanceoladas, alternadas, paralelinervias, se encuentran rodeando al tallo y por el haz presentan vellosidades; el tallo es simple, erecto, robusto, sin ramificaciones y no presenta entrenudos. Las inflorescencias son monoicas, las masculinas y las femeninas están separadas en la misma planta, las

masculinas presentan una panícula y las femeninas tienen una estructura vegetativa denominada espádice (Delgado, 2011).

La taxonomía del maíz mencionada por Llatas (2006) es:

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| <b>Dominio</b>    | : Eukarya            |
| <b>Reino</b>      | : Plantae            |
| <b>División</b>   | : Magnoliophyta      |
| <b>Clase</b>      | : Liliopsida         |
| <b>Subclase</b>   | : Liliidae           |
| <b>Orden</b>      | : Poales             |
| <b>Familia</b>    | : Poaceae            |
| <b>Subfamilia</b> | : Panicoideae        |
| <b>Tribu</b>      | : Andropogoneae      |
| <b>Género</b>     | : Zea                |
| <b>Especie</b>    | : <i>Zea mays</i> L. |

El maíz necesita climas relativamente cálidos. La temperatura requerida depende del estado de desarrollo, siendo la óptima 20-25°C en la germinación, 20-30°C durante el crecimiento vegetativo y 21-30°C en la floración. En cuanto al suelo, se prefieren los de textura franca pH 6-7,5 y humedad en el estado de capacidad de campo, con un requerimiento de 7000 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> en riego por profundidad y 3000-3500 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> en sistema tecnificado de riego por goteo. La preparación del terreno se hace en seco y con subsolador o un disco. Después, se aplica un riego de machaco o riego pesado y cuando el terreno está en capacidad de campo se usa una rastra ligera y posteriormente se nivela el terreno. Por lo general, en el Perú se usan la labranza convencional y la labranza mínima. Ésta última es la más indicada en verano en los valles de costa, con climas templados (Feijóo, 2005; Injante y Joyo, 2010; Delgado, 2011).

En la costa peruana principalmente se cultiva maíz amarillo duro y semiduro, destinados a la preparación de alimentos balanceados para animales y obtención de derivados. En la sierra se cultivan maíces blancos amiláceos, en su mayoría para la alimentación humana (Blanco, 2007). En la costa norte del

Perú, el maíz amarillo duro se puede sembrar todo el año, pero las mayores siembras son las que se realizan entre enero a julio, en invierno y entre octubre a diciembre, en verano. En la siembra de verano la floración, aparición de la panoja y el llenado de fruto, se dan en plena estación (enero-marzo) y en la siembra de invierno, la floración se observa en plena estación fría (Serquén, 2004; Injante & Joyo, 2010).

En la mayoría de regiones, el maíz en cultivo tecnificado en suelos de buenas condiciones, con buen manejo y una humedad adecuada responde a los niveles de fertilización de 120 a 180 Kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, 50 a 90 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo y 60 a 100 kg ha<sup>-1</sup> de potasio. En el caso del nitrógeno se recomienda aplicarlo en dos o tres etapas: 50% al momento de la siembra (estado VO) y 50% cuando el maíz tenga seis hojas completamente abiertas (V6), o el 20% en la siembra, 40% en el estado de seis hojas y 40% cuando el maíz tenga diez hojas completamente expandidas (V10). Por su parte, el fósforo y potasio se deben aplicar incorporándose al momento de la siembra, lo mismo que otros elementos necesarios como el azufre, magnesio y elementos menores (FENALCE, 2010).

El grano maduro de maíz es un cariósido constituido por el pedicelo, pericarpio, endospermo y embrión. El pedicelo es la estructura mediante la cual el grano se encuentra unido al olote y constituye 0,8% del peso del grano. El pericarpio contiene en su mayoría fibra (hemicelulosa, celulosa y lignina) y representa 53% del peso en grano. Por su parte, el endospermo representa 80-85% del peso en grano y está compuesto por 90% de almidón, 7% de proteína y un contenido mínimo de aceites y minerales. A su vez, el embrión o germen aporta 9,5-12% del peso del grano constituido por 35-40% de lípidos, 20% de proteínas y 10,5% de minerales. En general, la composición química del grano de maíz varía, pero en promedio presenta 62,6% de almidón, 12,5% de agua, 9,2 % de proteína, 23,8% de lípidos, 2,2% de fibra cruda, 1,3% de minerales y 8,4% de otros carbohidratos (Tovar, 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 Materiales**

El material biológico estuvo constituido por muestras de raíces de *Zea mays* L. “maíz” y bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno.

#### **3.1.2 Población y muestra**

Se consideró como población las bacterias endófitas diazotróficas de raíces de los cultivos de maíz en el distrito de Reque y se trabajó con las bacterias aisladas de 54 muestras, colectadas durante marzo-mayo de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1) determinada por los autores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Las variables cuantitativas fueron las bacterias nativas endófitas fijadoras de nitrógeno.

##### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres, 2000).

##### **3.2.3 Lugar de muestreo**

Se colectaron 54 muestras de raíces de maíz, establecidos en 17 campos

comerciales de maíz del distrito de Reque, región Lambayeque (Figura 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1, figura 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 Km<sup>2</sup> y se ubica entre los paralelos 06° 52' 00" latitud sur y 79° 49' 27" longitud oeste, (Municipalidad de Reque, 2013).

#### **3.2.4 Obtención de muestras de raíces**

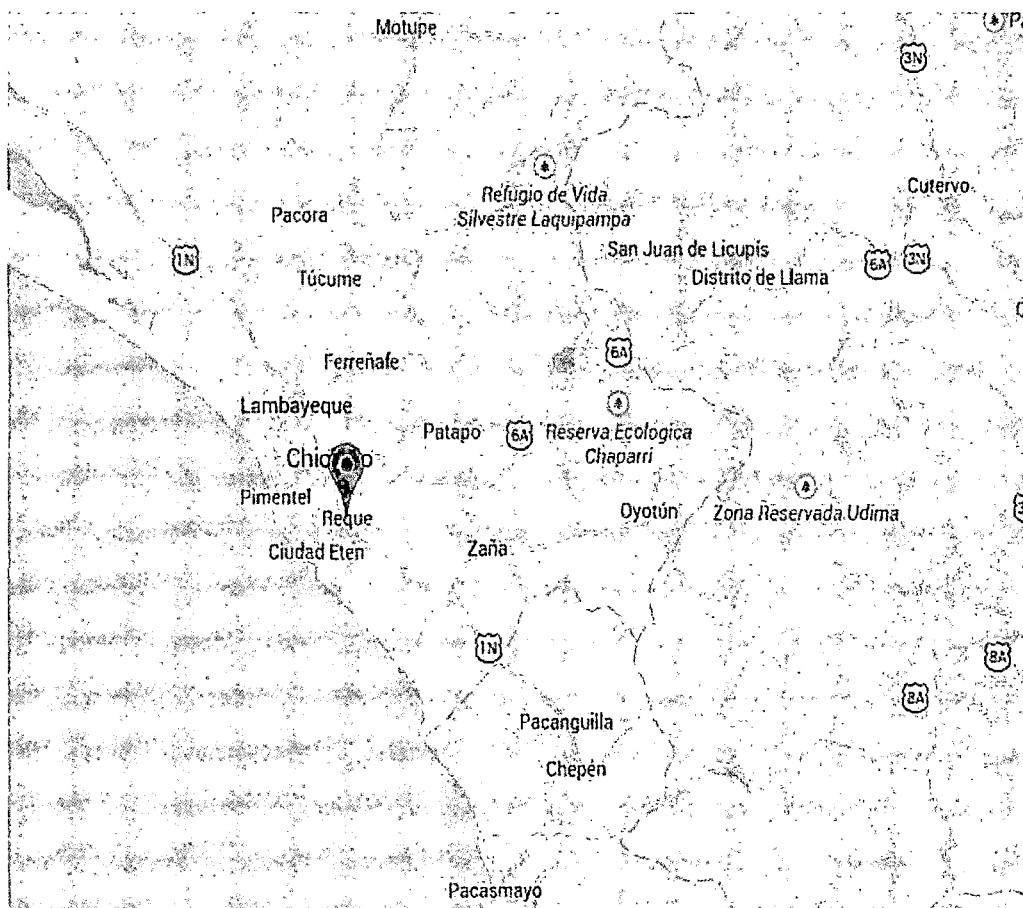
En cultivos de maíz en fase de floración (Figura 3), se colectaron aproximadamente 50 g de raíces (Figura 4), se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 5), debidamente identificadas e inmediatamente después, se transportaron en una caja térmica (10± 1°C) para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad nacional Pedro Ruiz Gallo.

En simultáneo al muestreo de raíces para el aislamiento de bacterias se colectó una muestra representativa de 1Kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Extensión Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es medianamente alcalino (pH 7,6) y ligeramente salino (CE 2,24 dSm<sup>-1</sup>), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (2,3%), nitrógeno (0,103%) y fósforo, disponible (5,9 ppm), así como un contenido medio de potasio (300,0 ppm).

#### **3.2.5 Aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas**

Las raíces de maíz fueron lavadas con agua potable (Figura 6) y desinfectadas superficialmente, previo al aislamiento de las bacterias endófitas, según la metodología descrita por Pérez *et al.* (2010). Para la desinfección superficial, por muestra se seleccionaron las diez raíces laterales más engrosadas (Figura 7), se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5cm (Figura 8), se pesaron 5g y se depositaron en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad (Figura 9), previamente esterilizados.





**Figura 1.** Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. Enero, 2014 (<http://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=ii>).

**Tabla 1.** Posición de los campos comerciales de *Zea mays* L. en Reque donde se realizó el muestreo de raíces durante marzo-mayo de 2014

| Campo agrícola | Punto | Posición (UTM)-17M |         | msnm | Campo agrícola | Punto | Posición (UTM)-17 |         | msnm |
|----------------|-------|--------------------|---------|------|----------------|-------|-------------------|---------|------|
| 1              | 3     | 629854             | 9241441 | 29 m | 10             | 29    | 629701            | 9241554 | 27 m |
| 2              | 4     | 629862             | 9241466 | 29 m | 11             | 30    | 629725            | 9241559 | 26 m |
| 3              | 5     | 629915             | 9241474 | 29 m | 12             | 31    | 629741            | 9241563 | 27 m |
| 4              | 6     | 629901             | 9241470 | 29 m | 13             | 32    | 629733            | 9241569 | 27 m |
| 5              | 7     | 629888             | 9241485 | 28 m | 14             | 33    | 629733            | 9241575 | 27 m |
| 6              | 8     | 629886             | 9241497 | 28 m | 15             | 34    | 629746            | 9241578 | 26 m |
| 7              | 9     | 629881             | 9241498 | 28 m | 16             | 35    | 629779            | 9241610 | 27 m |
| 8              | 10    | 629878             | 9241506 | 28 m | 17             | 36    | 629768            | 9241608 | 28 m |
| 9              | 11    | 629867             | 9241515 | 28 m | 1              | 37    | 629765            | 9241584 | 27 m |
| 10             | 12    | 629856             | 9241511 | 27 m | 2              | 38    | 629766            | 9241568 | 27 m |
| 11             | 13    | 629819             | 9241517 | 28 m | 3              | 39    | 629778            | 9241577 | 27 m |
| 12             | 14    | 629789             | 9241518 | 28 m | 4              | 40    | 629785            | 9241564 | 25 m |
| 13             | 15    | 629770             | 9241454 | 27 m | 5              | 41    | 629792            | 9241562 | 27 m |
| 14             | 16    | 629774             | 9241464 | 27 m | 6              | 42    | 629801            | 9241570 | 27 m |
| 15             | 17    | 629732             | 9241465 | 27 m | 7              | 43    | 629877            | 9241571 | 27 m |
| 16             | 18    | 629747             | 9241470 | 28 m | 8              | 44    | 629867            | 9241577 | 28 m |
| 17             | 19    | 629760             | 9241475 | 27 m | 9              | 45    | 629852            | 9241571 | 28 m |
| 1              | 20    | 629770             | 9241476 | 27 m | 10             | 46    | 629844            | 9241579 | 28 m |
| 2              | 21    | 629762             | 9241486 | 27 m | 11             | 47    | 629844            | 9241572 | 27 m |
| 3              | 22    | 629770             | 9241486 | 27 m | 12             | 48    | 629816            | 9241571 | 27 m |
| 4              | 23    | 629763             | 9241500 | 28 m | 13             | 49    | 629828            | 9241567 | 27 m |
| 5              | 24    | 629746             | 9241501 | 27 m | 14             | 50    | 629830            | 9241559 | 26 m |
| 6              | 25    | 629758             | 9241518 | 27 m | 15             | 51    | 629833            | 9241547 | 27 m |
| 7              | 26    | 629758             | 9241526 | 27 m | 16             | 52    | 629836            | 9241528 | 27 m |
| 8              | 27    | 629725             | 9241526 | 27 m | 17             | 53    | 629837            | 9241536 | 26 m |
| 9              | 28    | 629703             | 9241540 | 27 m | 9              | 54    | 629843            | 9241532 | 27 m |



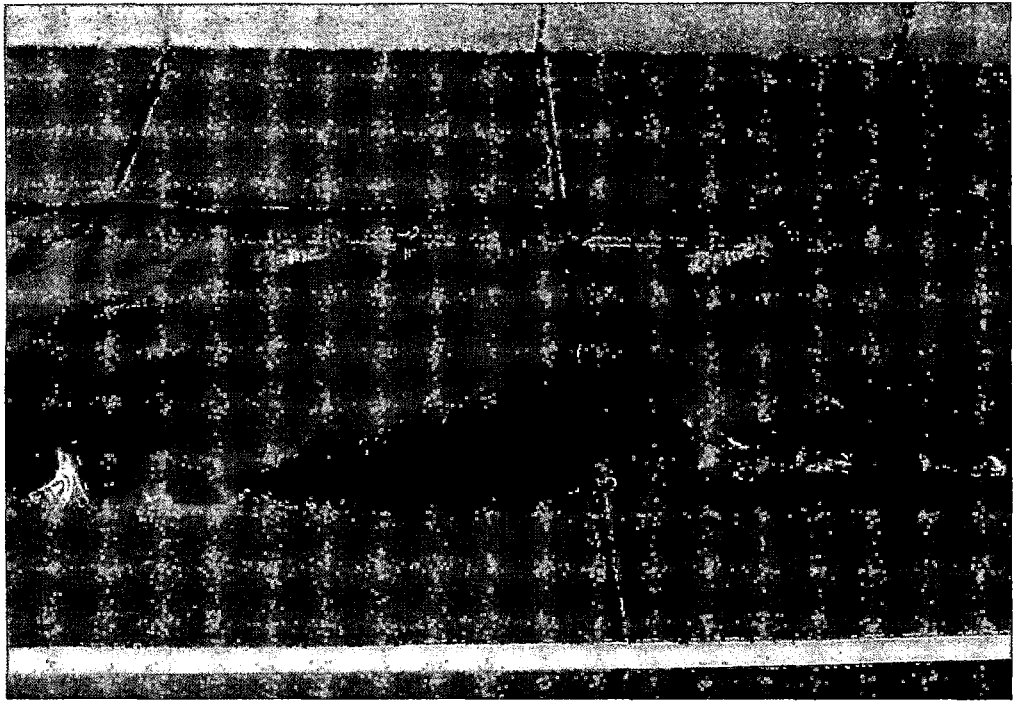
**Figura 2.** Ubicación de los campos comerciales de *Zea mays* L. en Reque, donde se realizó el muestreo de raíces durante marzo – mayo de 2014



**Figura 3.** Cultivos de *Zea mays* L. "maíz" en floración.



**Figura 4.** Extracción de raíces de *Zea mays* L.



**Figura 5.** Muestras de raíces de *Zea mays* L.

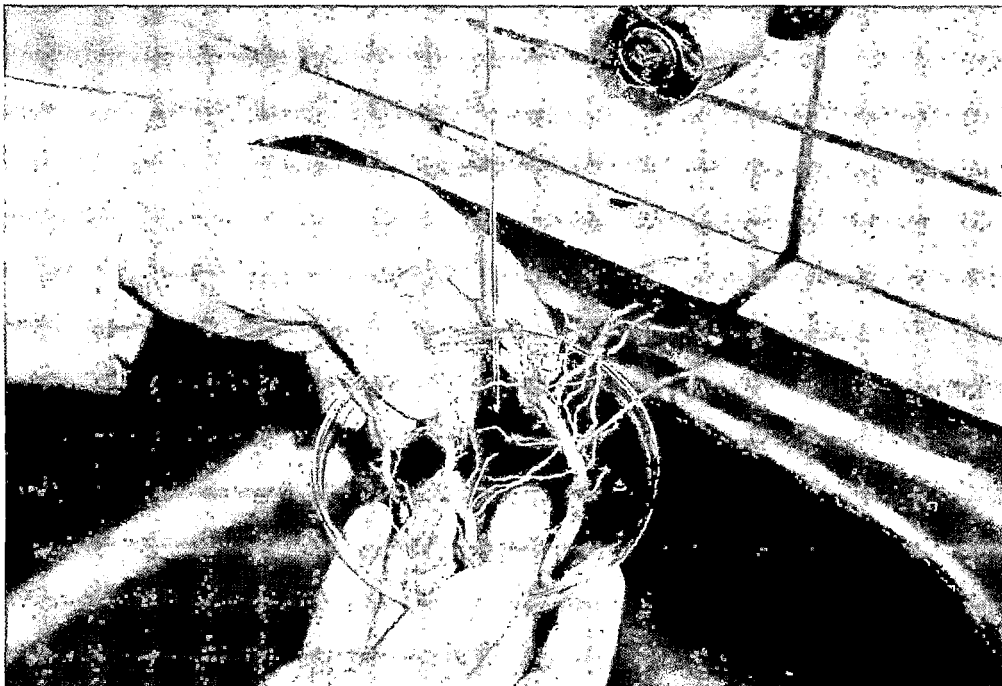
**Tabla 2.** Análisis físico- químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de *Zea mays* L. en Reque, Lambayeque, 2014\*

| Clase<br>Textural | pH   | CE<br>(dSm <sup>-1</sup> ) | MO<br>(%) | N<br>(%) | P<br>(ppm) | K<br>(ppm) |
|-------------------|------|----------------------------|-----------|----------|------------|------------|
| Fr.Ar.Ao          | 7,69 | 2,24                       | 2,3       | 0,103    | 5,9        | 300,0      |

\* Laboratorio de Suelos, Centro experimental Vista Florida  
Instituto Nacional de Innovación y Extensión agraria,  
Lambayeque.



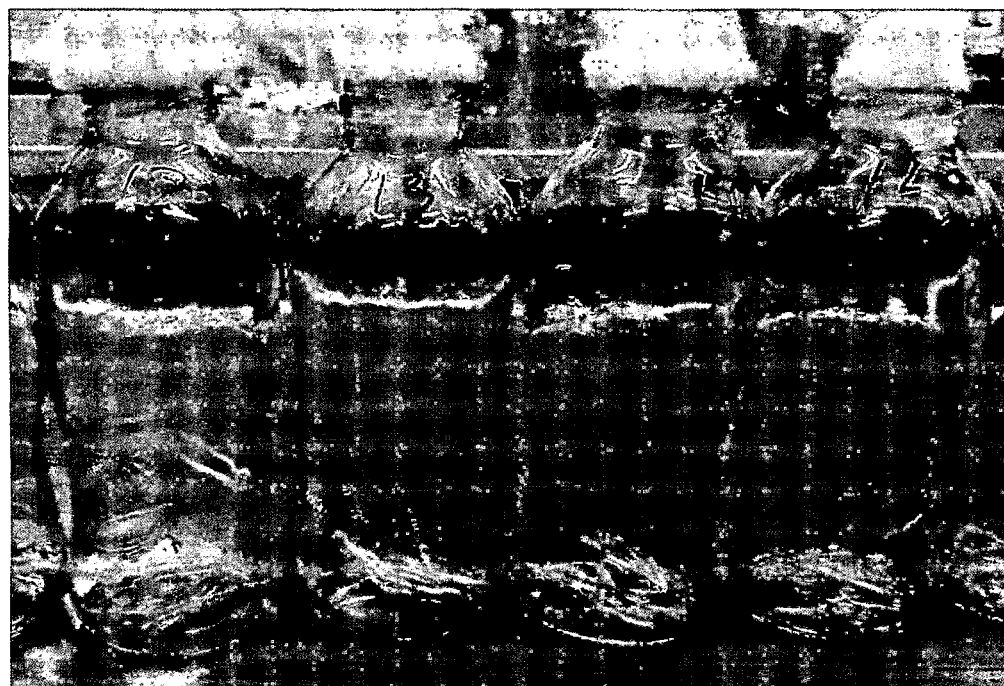
**Figura 6.** Lavado de raíces de *Zea mays* L. con agua potable.



**Figura 7.** Selección de raíces laterales engrosadas.



**Figura 8.** Corte de raíces de *Zea mays* L.



**Figura 9.** Frascos con fragmentos de raíces de *Zea mays* L.

Las raíces fueron lavadas con 50mL de agua destilada esterilizada más 0,005% detergente neutro por 1 minuto (Figura 10), enjuagadas por cuatro veces consecutivas con agua destilada esterilizada, a razón de 1 minuto por enjuague (Figura 11), seguido de agitación (Figura 12) por 15 minutos en solución tampón fosfato de potasio  $0,05\text{molL}^{-1}$  (Anexo 2), inmersión por 1 minuto en alcohol 70% (Figura 13) y agitación por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) 5% más Tween 80 (Figura 14). Después, el tejido vegetal fue llevado a nuevos frascos de vidrio previamente esterilizados, para la inmersión por 1 minuto en alcohol 70%, seguido por agitación por 15 minutos en solución tampón y finalmente lavado por cuatro veces con agua destilada esterilizada.

#### **a. Verificación de la desinfección**

Para verificar la desinfección (Figura 15) superficial de las raíces (Pérez *et al.*, 2010), alícuotas del último lavado fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas.

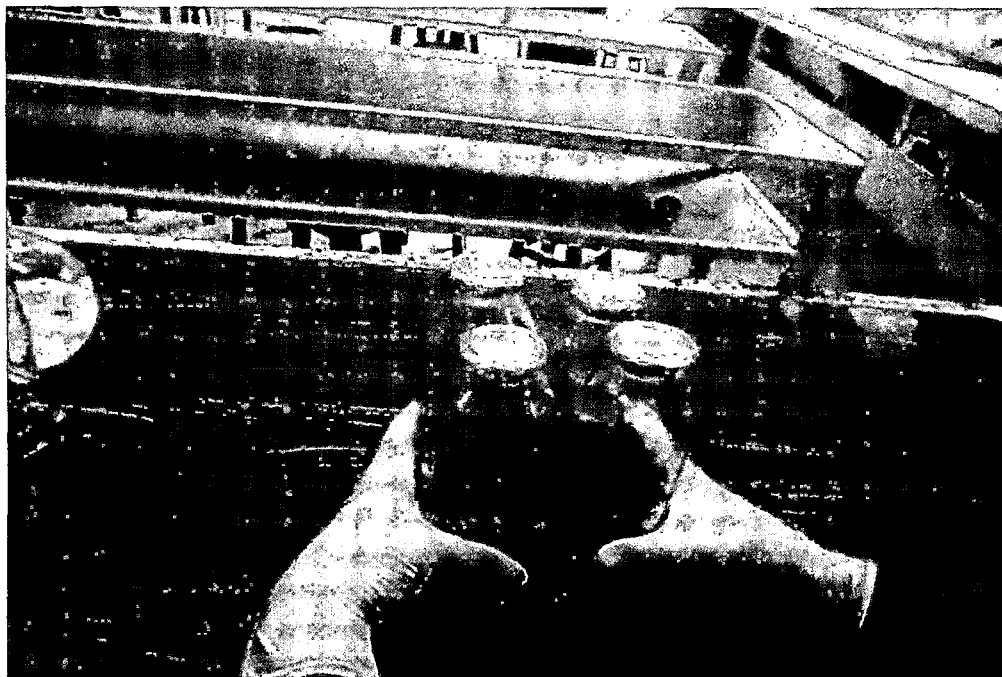
#### **b. Siembra y aislamiento**

El tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en papel secante, para eliminar el exceso de humedad (Figura 16) y luego fue llevado a bolsas de polietileno de 16x15 cm (Figura 17). A continuación, se agregó 1mL de solución salina esterilizada ( $\text{NaCl}$  0,85%, p/v), con ayuda de un pilón el tejido se maceró cuidadosamente (Figuras 18,19) y con una jeringa se extrajo 1mL (Figura 20), sembrándose inmediatamente una alícuota ( $10^{-1}$ ) en medios semisólidos sin nitrógeno (Figura 21, anexo 2). Adicionalmente, se extrajo 1mL del macerado, se diluyó en solución salina esterilizada ( $10^{-2}$ ), se tomó una alícuota y se sembró. Los medios de cultivo semisólidos (Figuras 22, 23) fueron NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la incubación a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días, se seleccionaron los medios semisólidos donde se observó con mayor nitidez una película blanquecina de 3-5 mm bajo la superficie y el viraje del indicador (Figura 24) y se realizaron subcultivos en los mismos medios por dos veces consecutivas (Figura 25).





**Figura 10.** Lavado de raíces de *Zea mays* L. con agua destilada más detergente neutro.



**Figura 11.** Enjuague de raíces de *Zea mays* L. con agua destilada esterilizada.



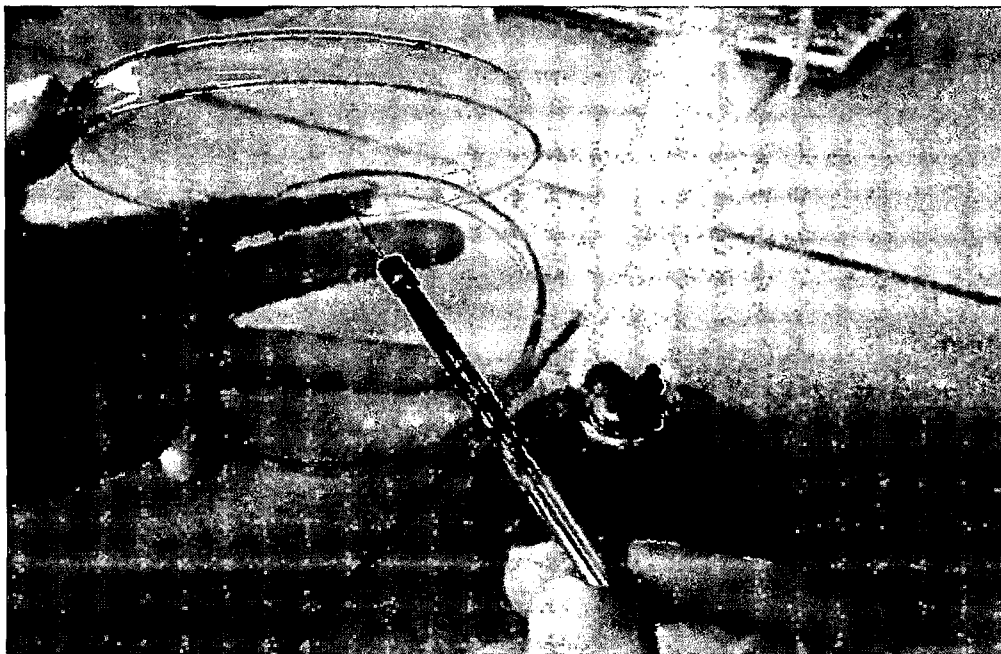
Figura 12. Lavado de raíces de *Zea mays* L. en solución tampón fosfato de potasio.



Figura 13. Inmersión de fragmentos de raíces de *Zea mays* L. en alcohol.



**Figura 14.** Inmersión de fragmentos de raíces de *Zea mays* L. en solución de hipoclorito de sodio-Tween 80



**Figura 15.** Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección.

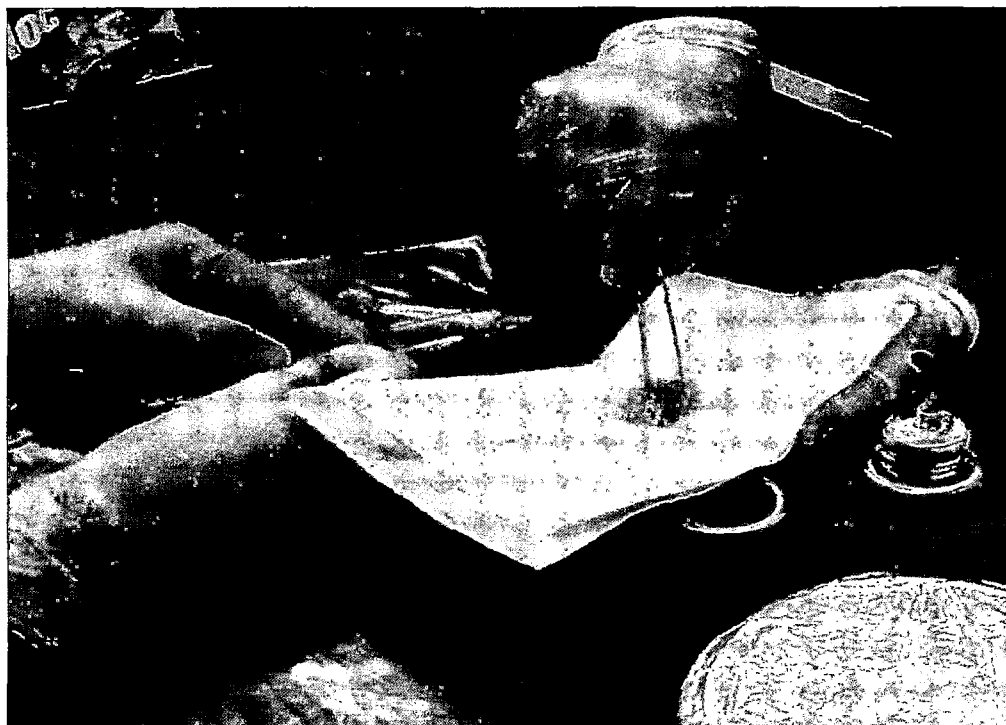


Figura 16. Fragmentos de raíces de *Zea mays* L. en papel secante esterilizado.

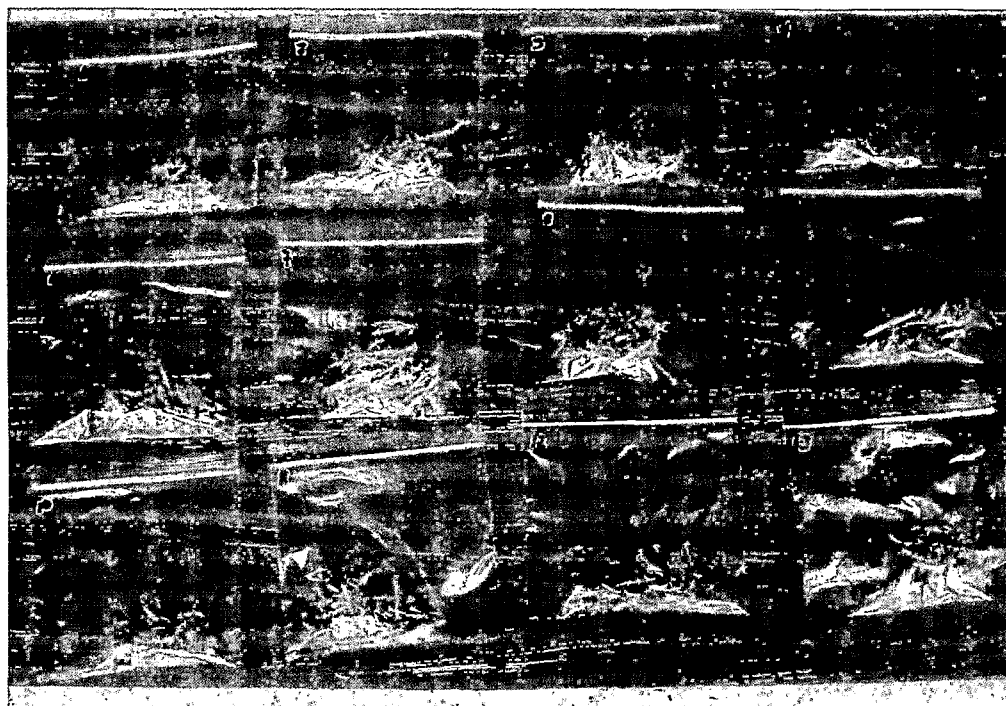
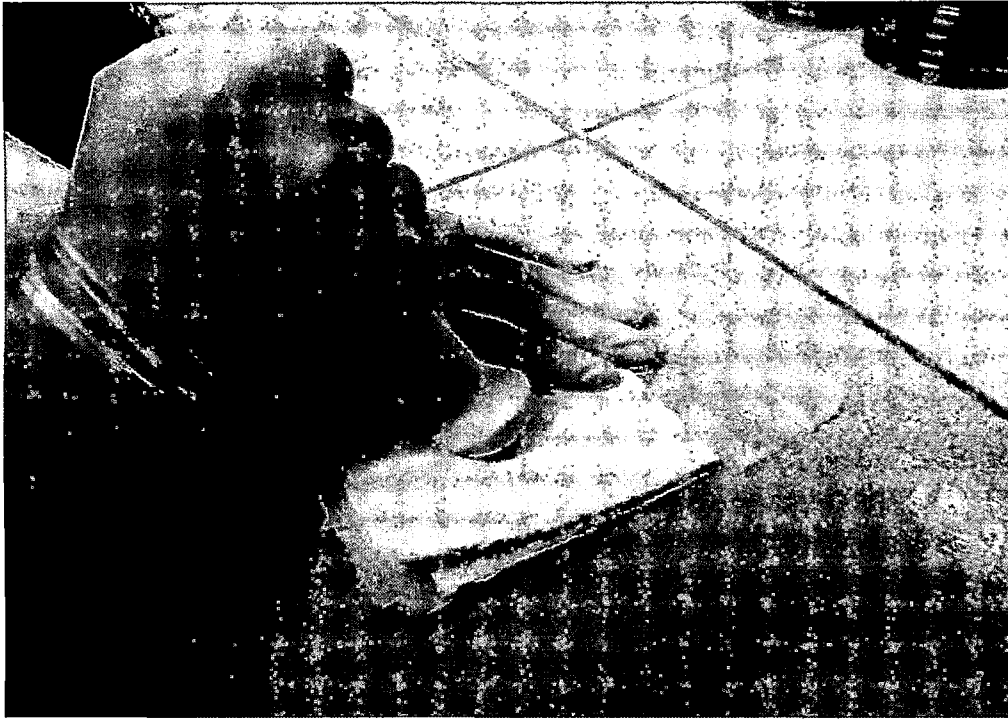
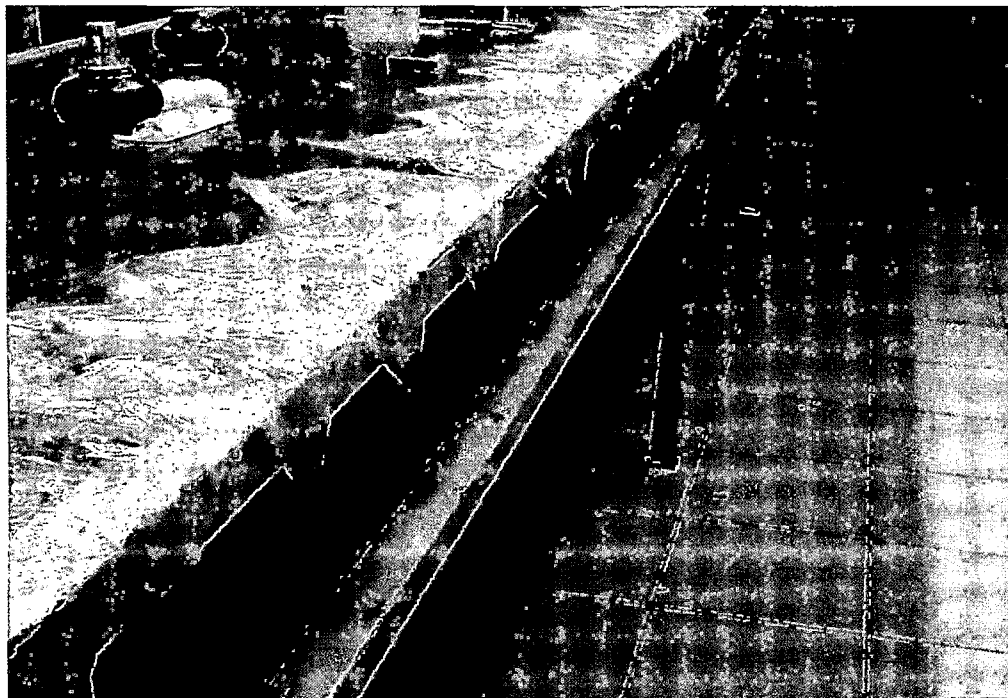


Figura 17. Fragmentos de raíces de *Zea mays* L. desinfectados.



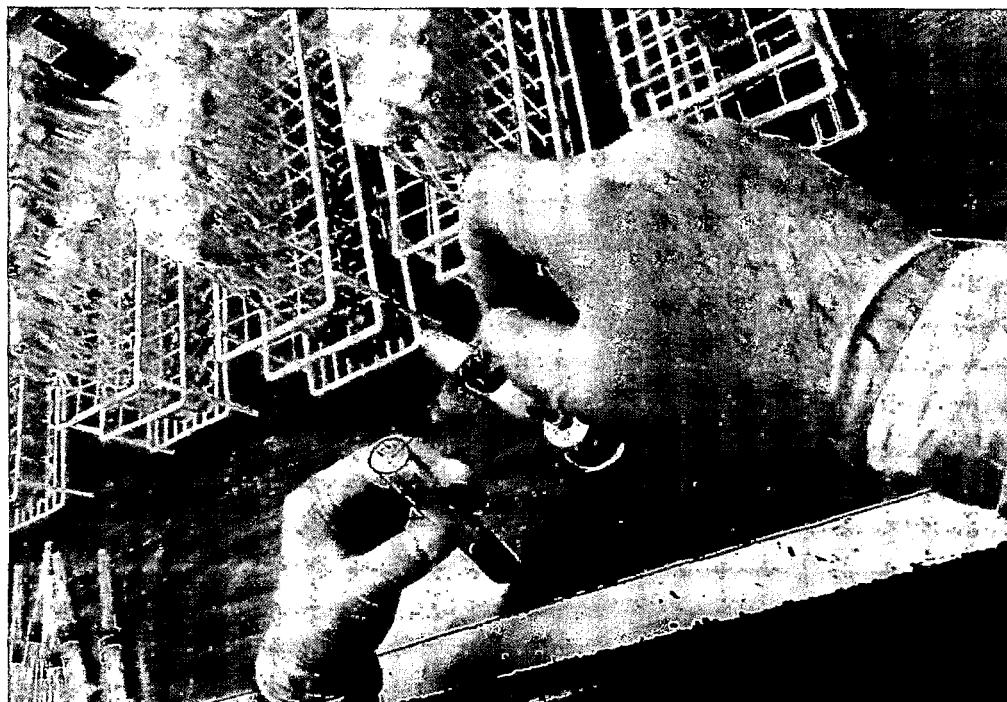
**Figura 18.** Macerado de raíces de fragmentos de *Zea mays* L.



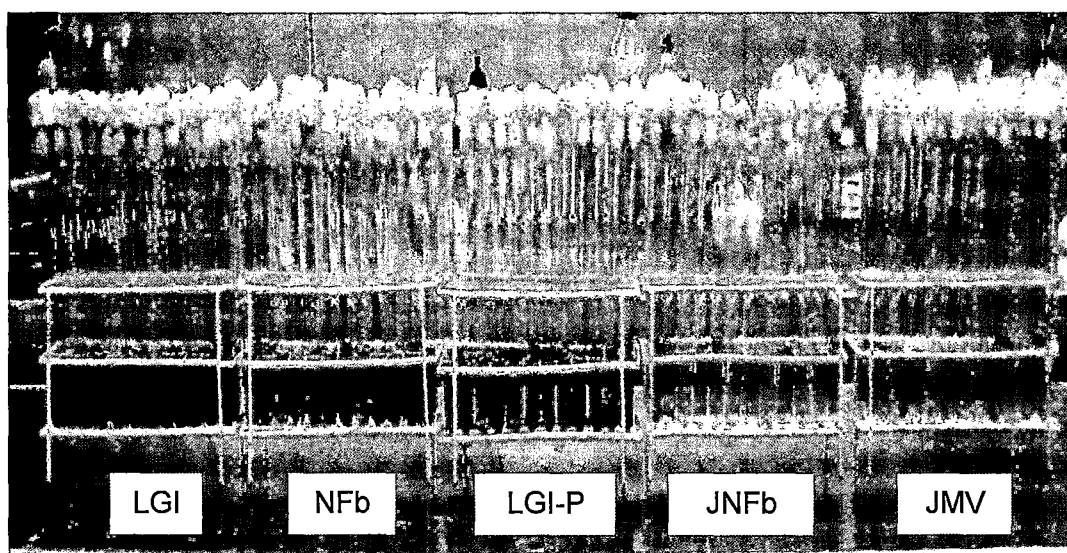
**Figura 19.** Separación del macerado de raíces de *Zea mays* L.



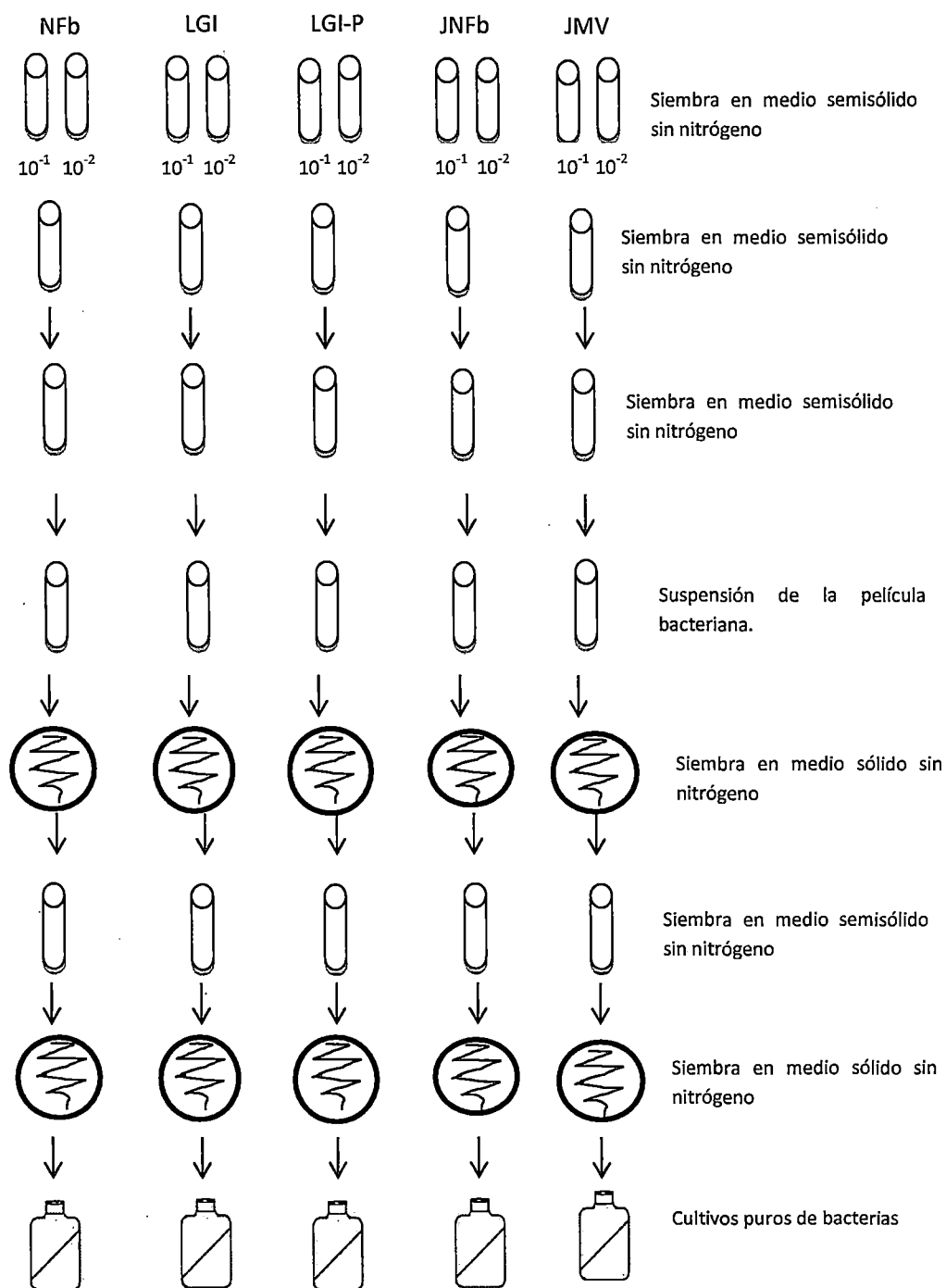
**Figura 20.** Toma de muestra de macerado de raíces de *Zea mays* L.



**Figura 21.** Siembra de macerado de raíces en medio semisólido sin nitrógeno.

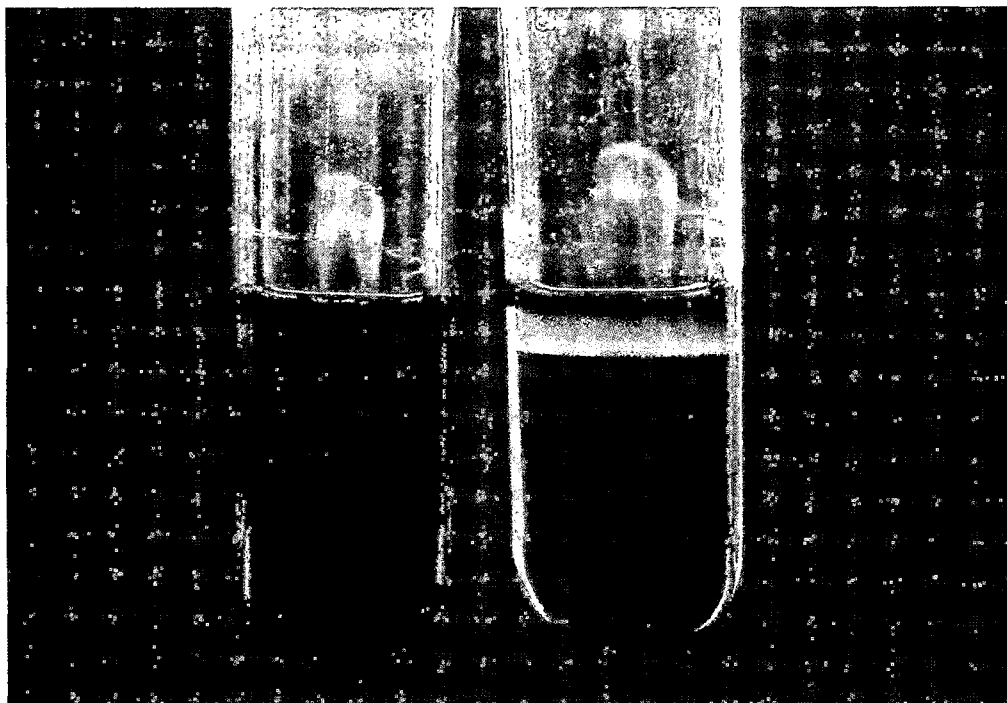


**Figura 22.** Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias.

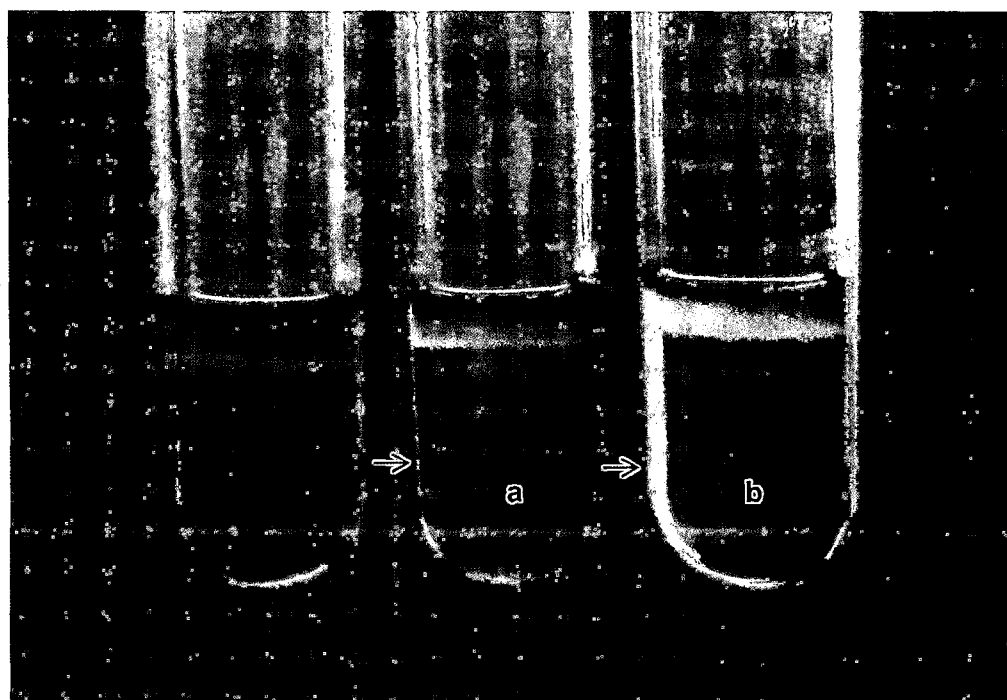


**Figura 23.** Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.





**Figura 24.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.



**Figura 25.** Primer y segundo subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.

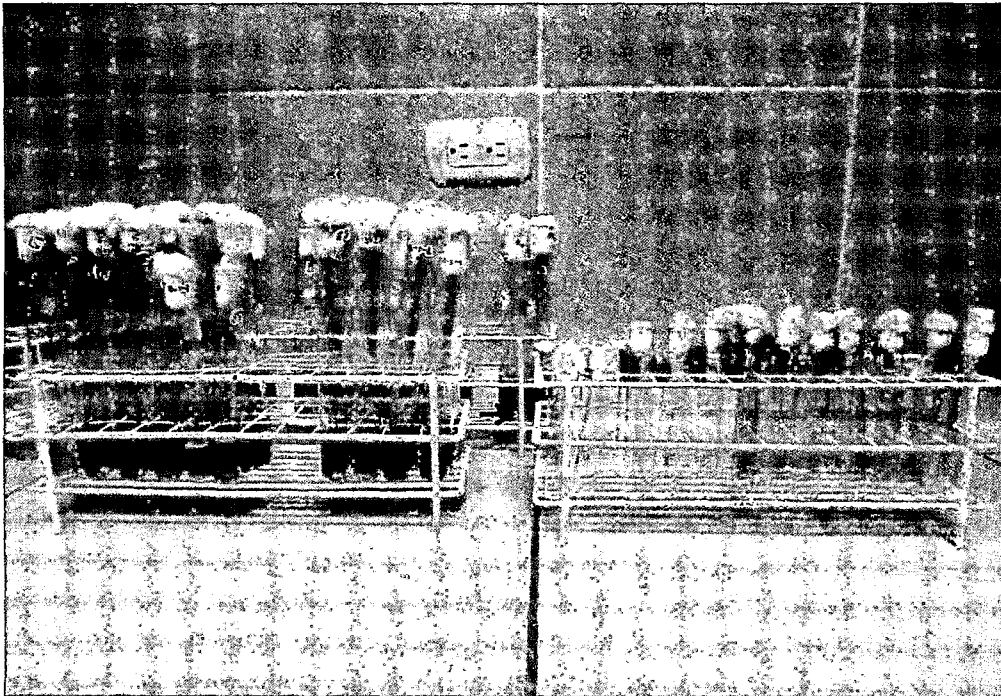
Para el aislamiento, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada (Figura 26) y se sembró en los medios sólidos respectivos (Figura 27, anexo 2), incubando a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días. Con las colonias características (Figura 28), se realizaron tinciones de Gram, se cultivaron nuevamente en el medio semisólido libre de nitrógeno (Tercer subcultivo) y posteriormente en el medio sólido respectivo, para la obtención de los cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno. Para su mantenimiento, éstos se sembraron por duplicado en agar nutritivo y medio semisólido libre de nitrógeno (Figura 29), siendo guardados en refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ).

### **3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno**

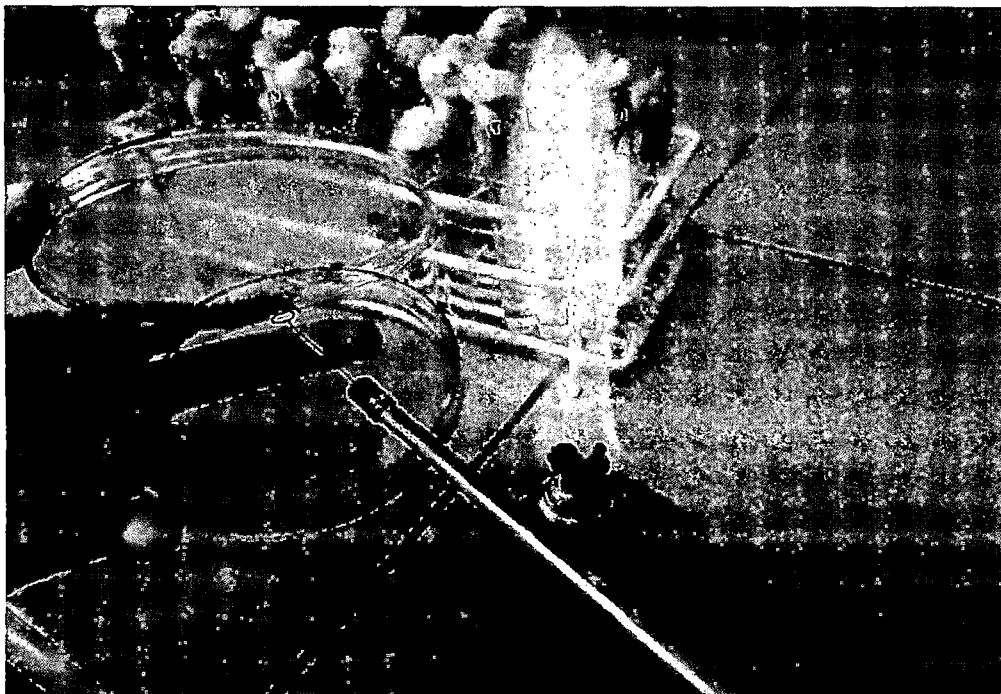
La identificación del género de las bacterias endófitas nativas fijadoras de nitrógeno se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Brenner *et al.* 2005), Schoebitz, (2006) y Garrido, (2007). Con todas las bacterias se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa y motilidad. Para el género *Azospirillum*, las pruebas fueron tolerancia a NaCl 3%, utilización de sacarosa, glucosa, manitol y ácido málico como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno (Figuras 30, 31, 32, 33) y requerimiento de biotina (Tabla 3). Para el género *Herbaspirillum* se investigó el crecimiento en caldo NFb, hidrólisis de la urea y reducción de nitratos (Tabla 4). Para el género *Gluconacetobacter* se investigó el crecimiento en agar Batata, hidrólisis de la gelatina y almidón y utilización de citrato, glucosa y sacarosa al 30% (Tabla 5). Para el género *Burkholderia*, se realizaron pruebas de resistencia a la polimixina-B (300 UI), descarboxilación de lisina y prueba de hidrólisis de la urea (Tabla 6).

### **3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de bacterias**

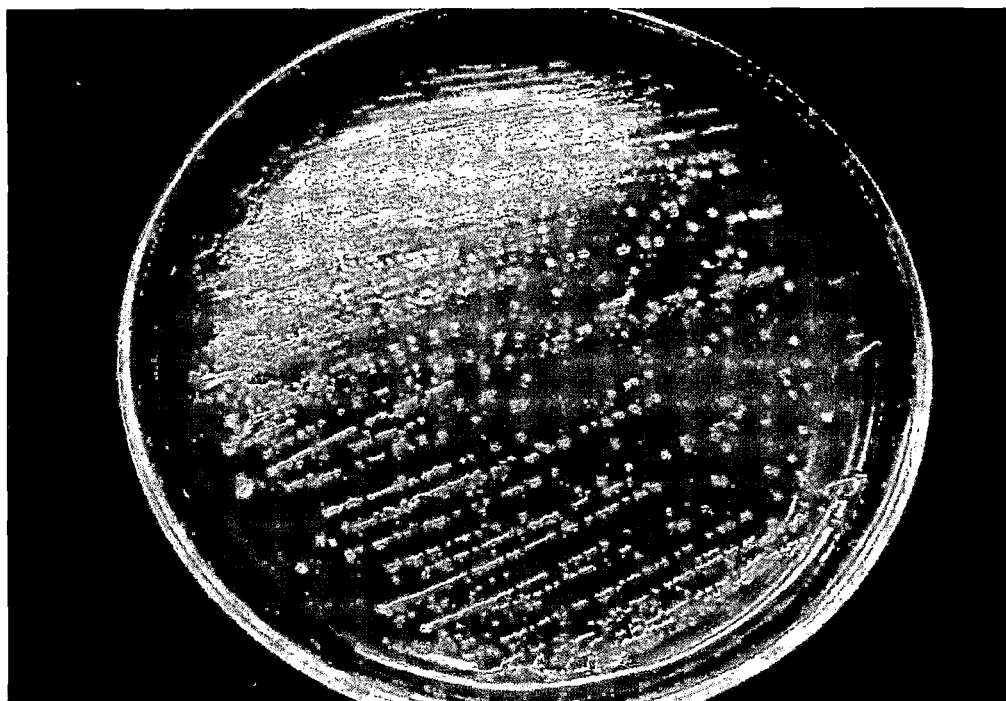
Las bacterias endófitas diazotróficas identificadas (Figura 34) se sembraron en el medio semisólido respectivo en agar nutritivo y se mantuvieron a temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C}$ ) y refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ), repectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días.



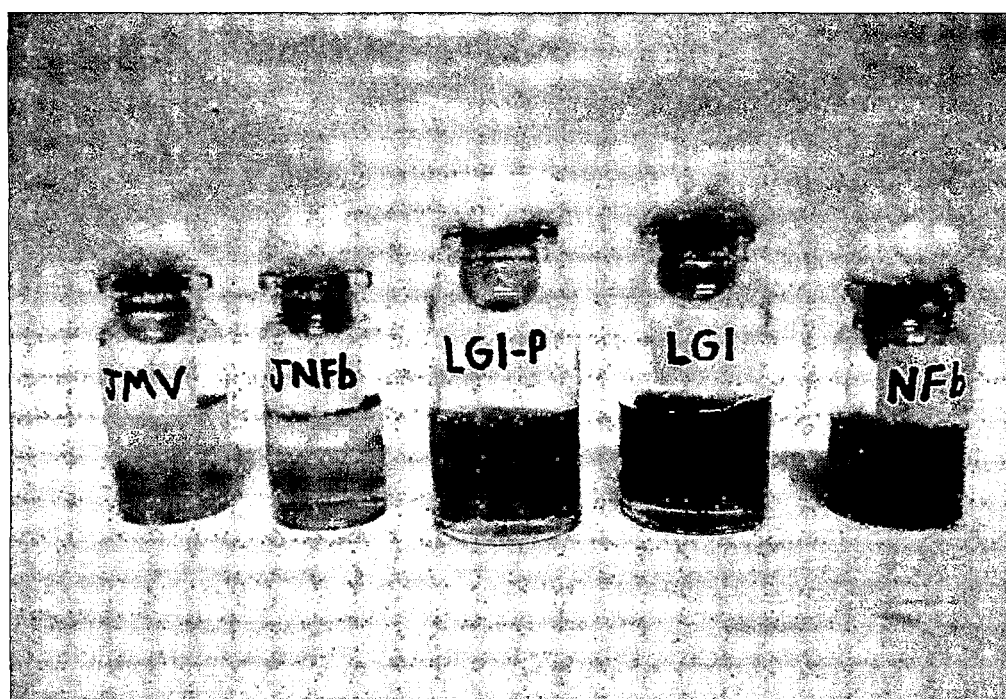
**Figura 26.** Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada.



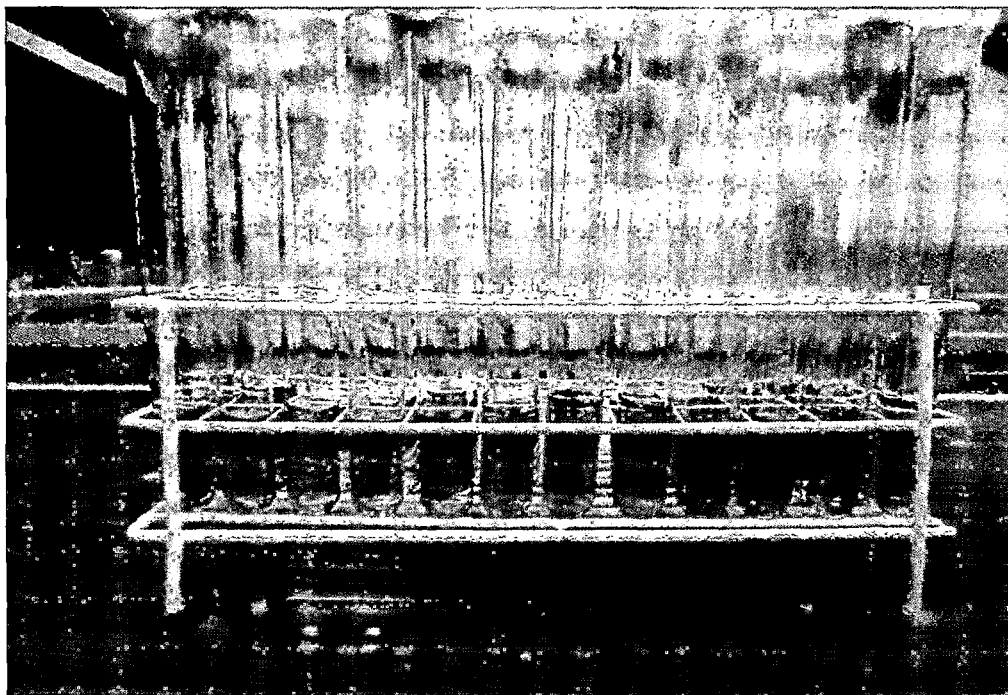
**Figura 27.** Siembra de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio sólido.



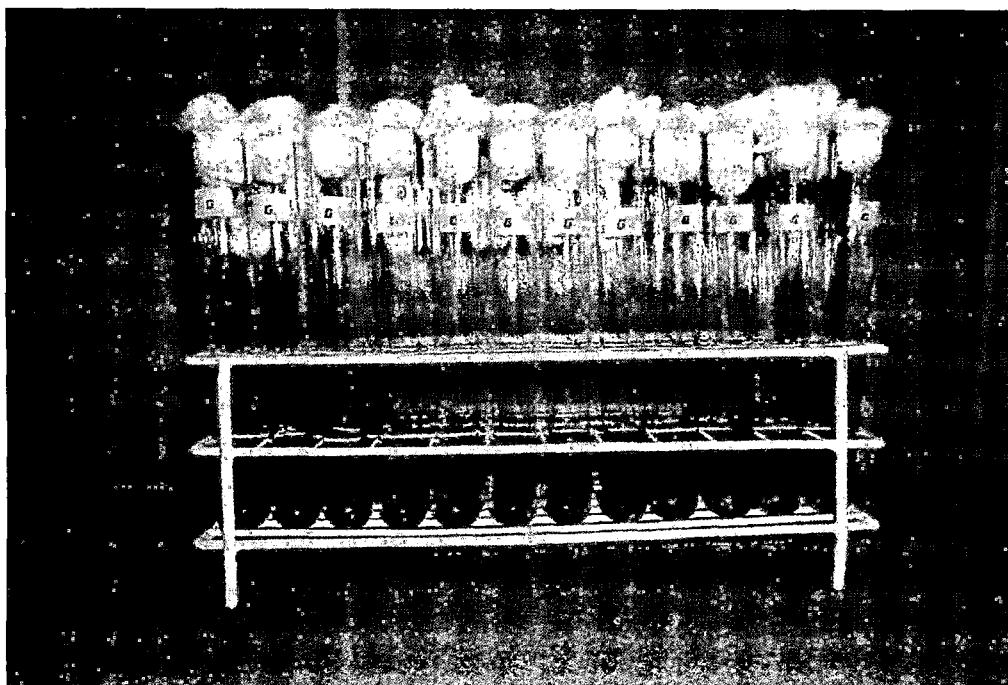
**Figura 28.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.



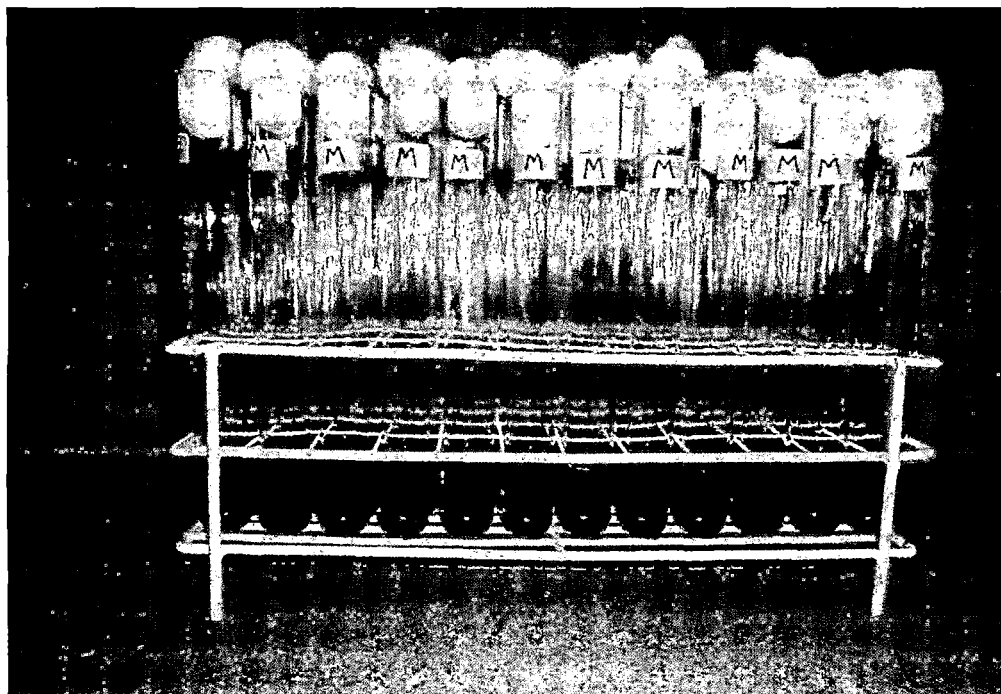
**Figura 29.** Bacterias fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.



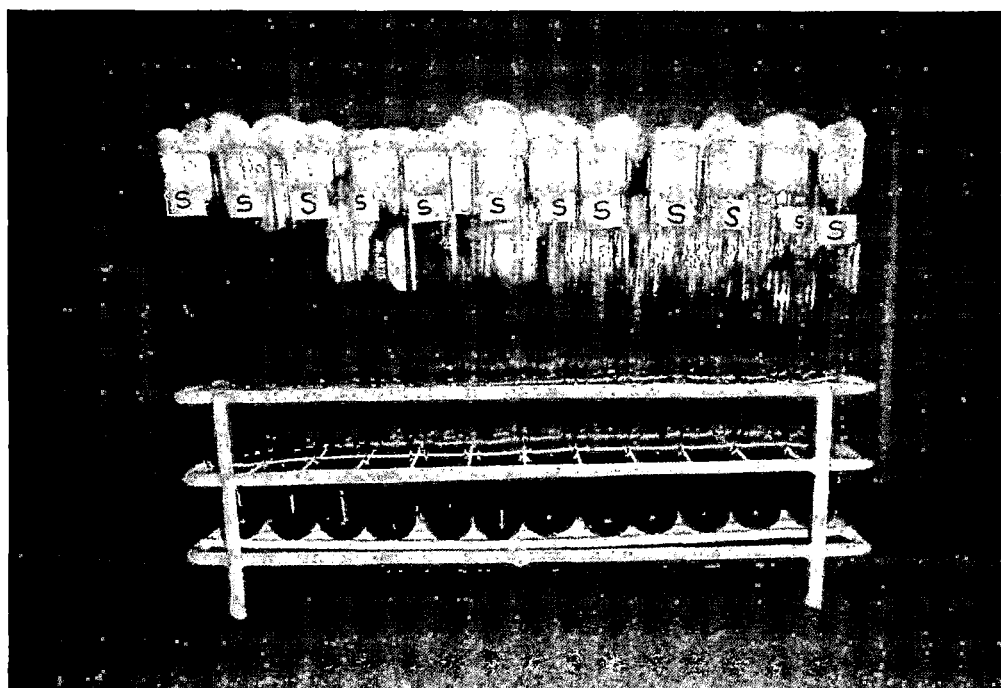
**Figura 30.** Medio NFb semisólido con ácido málico para la identificación de *Azospirillum* spp.



**Figura 31.** Medio NFb semisólido con glucosa para la identificación de *Azospirillum* spp.



**Figura 32.** Medio NFb semisólido con manitol para la identificación de *Azospirillum* spp.



**Figura 33.** Medio NFb semisólido con sacarosa para la identificación de *Azospirillum* spp.

**Tabla 3.** Caracaterísticas diferenciales de las especies de *Azospirillum* spp.

| Características       | <i>A. brasilense</i> | <i>A. lipoferum</i> | <i>A. halopraeferens</i> | <i>A. irakense</i> | <i>A. amazonense</i> |
|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|
| Células pleomórficas  | -                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| Tinción de Gram       | -                    | -                   | -                        | -                  | -                    |
| Motilidad             | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| Catalasa              | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| Oxidasa               | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| biotina               | -                    | +                   | +                        | -                  | -                    |
| NaCl 3%               | +/-                  | -                   | +                        | +                  | -                    |
| Ureasa                | +                    | +                   | +                        | -                  | +                    |
| Gelatinasa            | -                    | -                   | +                        | +                  | -                    |
| Reducción de nitratos | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| PHA                   | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| Fuente de C:          |                      |                     |                          |                    |                      |
| ▪ Ácido málico        | +                    | +                   | +                        | +                  | +                    |
| ▪ Glucosa             | -                    | +                   | -                        | -                  | -                    |
| ▪ Manitol             | -                    | +                   | +                        | -                  | -                    |
| ▪ Sacarosa            | -                    | +/-                 | -                        | +                  | +                    |

\* (+) positivo; (-) negativo.

\* Brenner *et al.* (2005); Schoebitz (2006); Garrido (2007); Mehnaz *et al.* (2007); Carrera (2012).

**Tabla 4.** Características diferenciales de *Herbaspirillum* spp.

| Características          | <i>Herbaspirillum</i> spp. |
|--------------------------|----------------------------|
| Células                  | Bacilos curvos             |
| Tinción de Gram          | -                          |
| Motilidad                | +                          |
| Catalasa                 | +/-                        |
| Oxidasa                  | +                          |
| Crecimiento en caldo NFb | -                          |
| Ureasa                   | +/-                        |
| Fuente de C:             |                            |
| ▪ Ácido málico           | +                          |
| ▪ Glucosa                | +                          |
| ▪ Manitol                | +                          |
| ▪ Sacarosa               | +                          |

\* (+) positivo; (-) negativo.

\* Eckert, *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz (2006); Garrido (2007).

**Tabla 5.** Características diferenciales de *Gluconoacetobacter* spp.

| Características       | <i>Gluconoacetobacter</i> spp. |
|-----------------------|--------------------------------|
| Células               | Bacilos pequeños               |
| Tinción de Gram       | -                              |
| Motilidad             | +                              |
| Catalasa              | +                              |
| Oxidasa               | +                              |
| Ureasa                | +                              |
| Gelatinasa            | +                              |
| Hidrolisis de almidón | -                              |
| Reducción de nitratos | +                              |
| Gránulos de PHA       | +                              |
| Fuente de C:          |                                |
| ▪ Ácido málico        | +                              |
| ▪ Glucosa             | +                              |
| ▪ Manitol             | +                              |
| ▪ Sacarosa            | +                              |

\* (+) positivo; (-) negativo.

\* Eckert, *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz (2006); Garrido (2007).

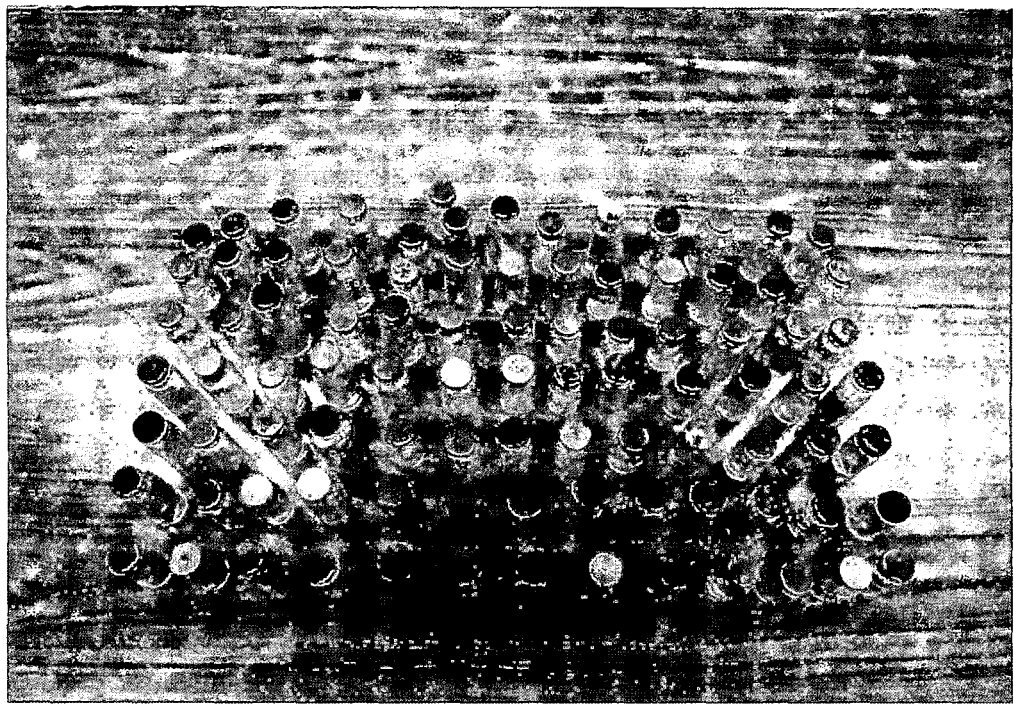


**Tabla 6.** Características diferenciales de *Burkholderia* spp.

| Características                    | <i>Burkholderia</i> spp. |
|------------------------------------|--------------------------|
| Células                            | Bacilos rectos           |
| Tinción de Gram                    | -                        |
| Motilidad                          | +                        |
| Catalasa                           | +                        |
| Oxidasa                            | +                        |
| Gelatinasa                         | +                        |
| Descarboxilación de lisina         | +                        |
| Resistencia a Polimixina B (300UI) | +                        |
| Fuente C:                          |                          |
| ▪ Ácido málico                     | +                        |
| ▪ Glucosa                          | +                        |
| ▪ Manitol                          | +                        |
| ▪ Sacarosa                         | +                        |

\* (+) positivo; (-) negativo.

\* Eckert, *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz (2006); Garrido (2007).



**Figura 34.** Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.

### **3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro***

Para la cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias endófitas, se utilizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito (Figura 35,) descrito por Lara *et al.* (2007) y Cadena & Martínez (2011). Cada bacteria cultivada en el medio sólido sin nitrógeno correspondiente, por 48 horas, fue inoculada por triplicado en tubos de 15 x 150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Anexo 2) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10mL del sobrenadante y centrifugarlos (3500 rpm) durante 5 minutos (Figuras 36, 37 ).

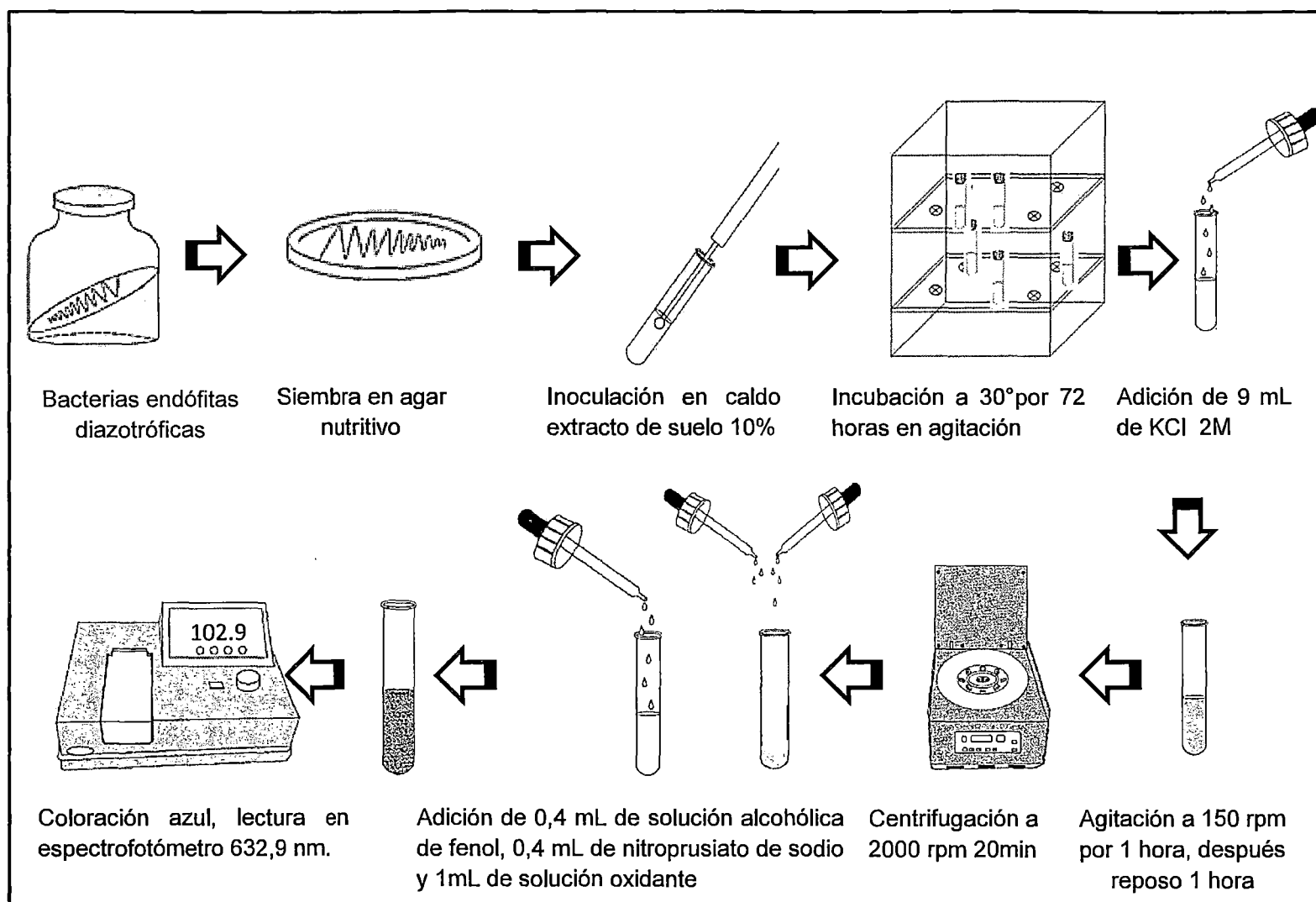
Los sobrenadantes se llevaron a tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron para mezclar y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La positividad a la fijación de nitrógeno estuvo dada por una coloración azul y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm (Figura 38). Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).

### **3.2.9 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias de cada uno de los géneros investigados, que alcanzaron los mayores valores de nitrógeno fijado como amonio, fueron seleccionadas para su análisis molecular.

### **3.2.10 Identificación del gen *nifH* en bacterias endófitas aisladas de raíces de maíz**

Las bacterias seleccionadas fueron cultivadas en sus respectivos medios sólidos sin nitrógeno, durante 24 horas, para obtener colonias representativas, extraer el ADN e identificar el gen *nifH*.



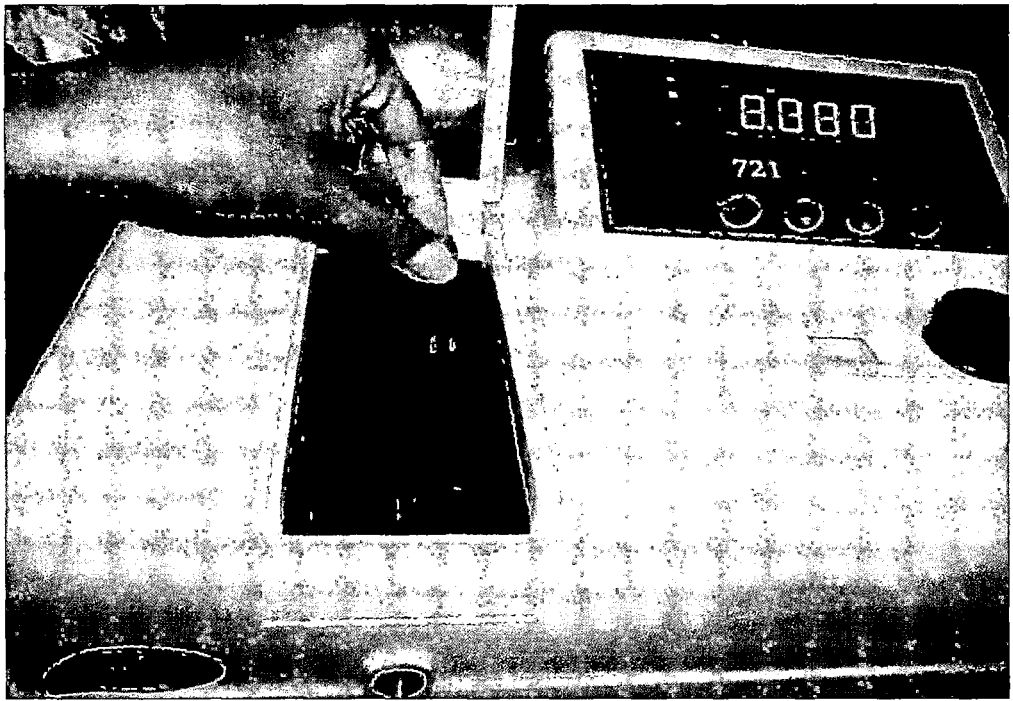
**Figura 35.** Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* por bacterias.



**Figura 36.** Adición de KCl al caldo extracto de suelo.



**Figura 37.** Centrifugación del caldo extracto de suelo mezclado con KCl.



**Figura 38.** Lectura de la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible

#### **a. Extracción de ADN**

Se tomó una colonia representativa de cada género bacteriano se resuspendió en un Eppendorf con 20uL de buffer y se calentó en baño maría a 85°C durante 5 minutos. Luego, se mezcló con 225 uL de agua bidestilada y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos (Meneses 2009). Los lisados fueron conservados a -20°C y el sobrenadante se utilizó para la amplificación del ADN (Figuras 39, 40, 41,42).

#### **b. Identificación del gen *nifH***

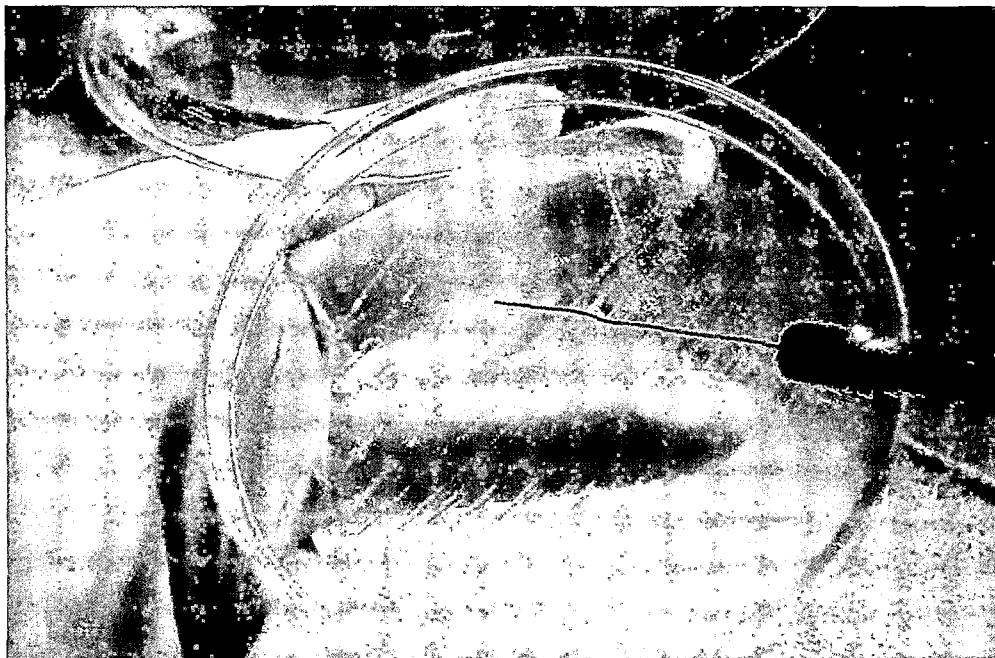
Los Eppendorf conteniendo el material genético, sellados herméticamente (Figura 43), junto a un cultivo puro en agar nutritivo de cada bacteria seleccionada fueron enviados al laboratorio del Grupo de Cristalografía del Instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo, Brasil donde se realizó la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5%, para la observación de una banda con similar peso molecular al gen *nifH*.

#### **3.2.11 Análisis de los datos**

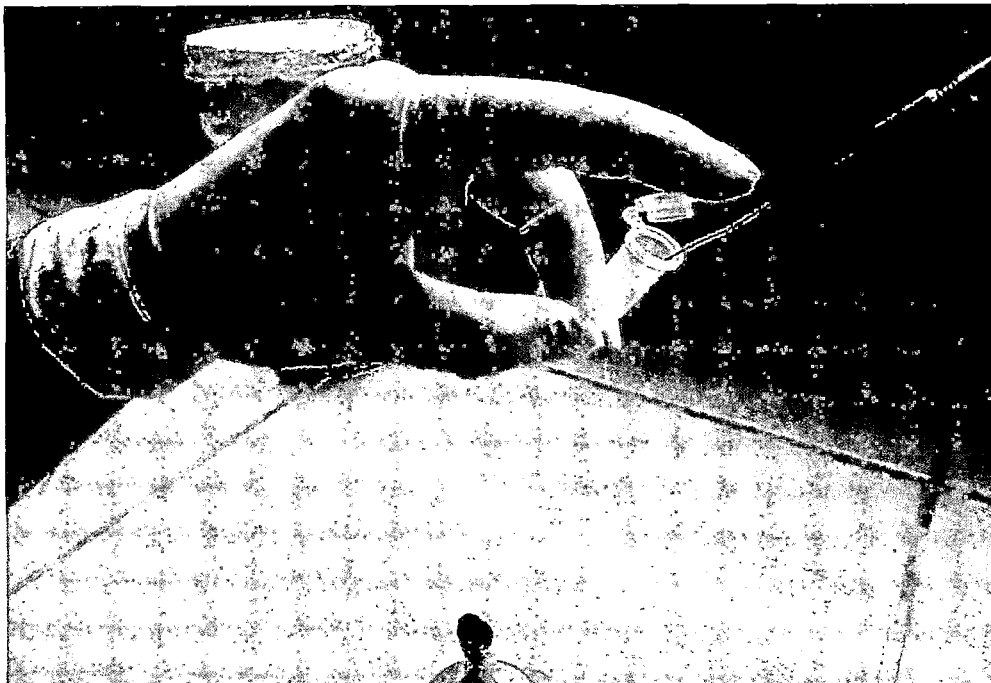
Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras para analizar las características de las bacterias endófitas diazotróficas. Se realizó el análisis de varianza de los valores de nitrógeno fijado y la superioridad entre las bacterias, se determinó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández *et al.*, 2010). Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2010.



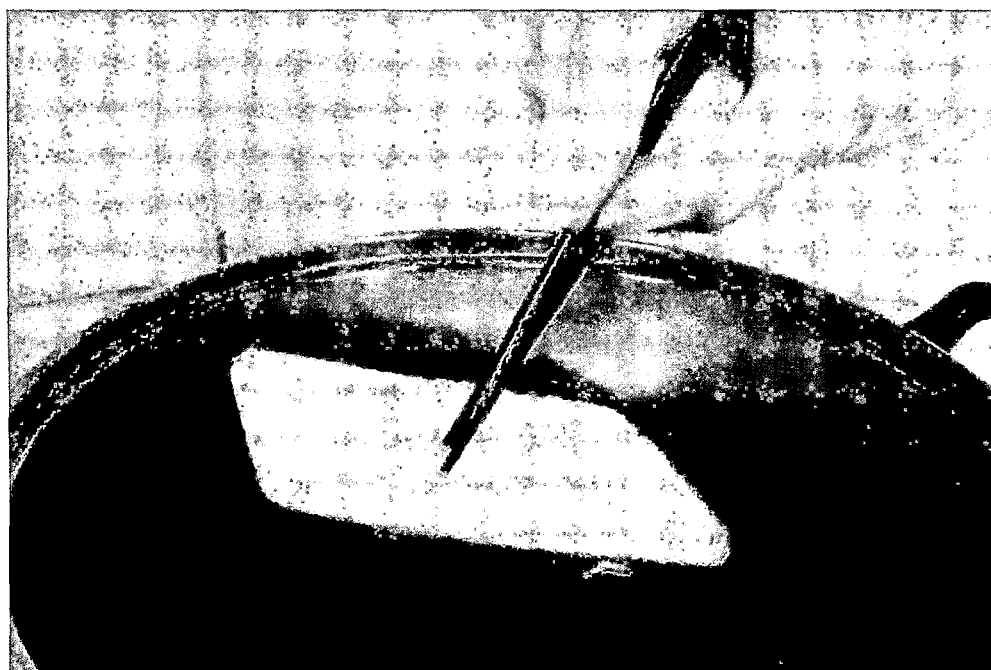
**Figura 39.** Bacterias representativas de cada género identificado para la extracción de ADN.



**Figura 40.** Selección de una colonia bacteriana representativa.

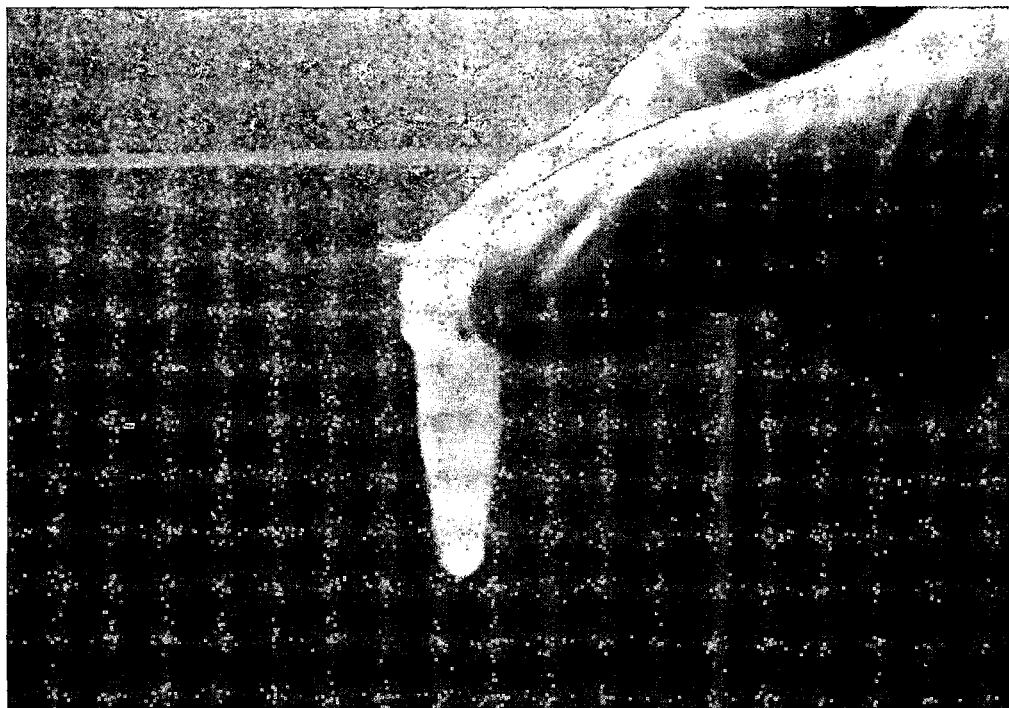


**Figura 41.** Suspensión de colonia bacteriana en un Eppendorf con agua bidestilada.



**Figura 42.** Calentamiento de bacterias en baño maría.





**Figura 43.** Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.

## **IV. RESULTADOS**

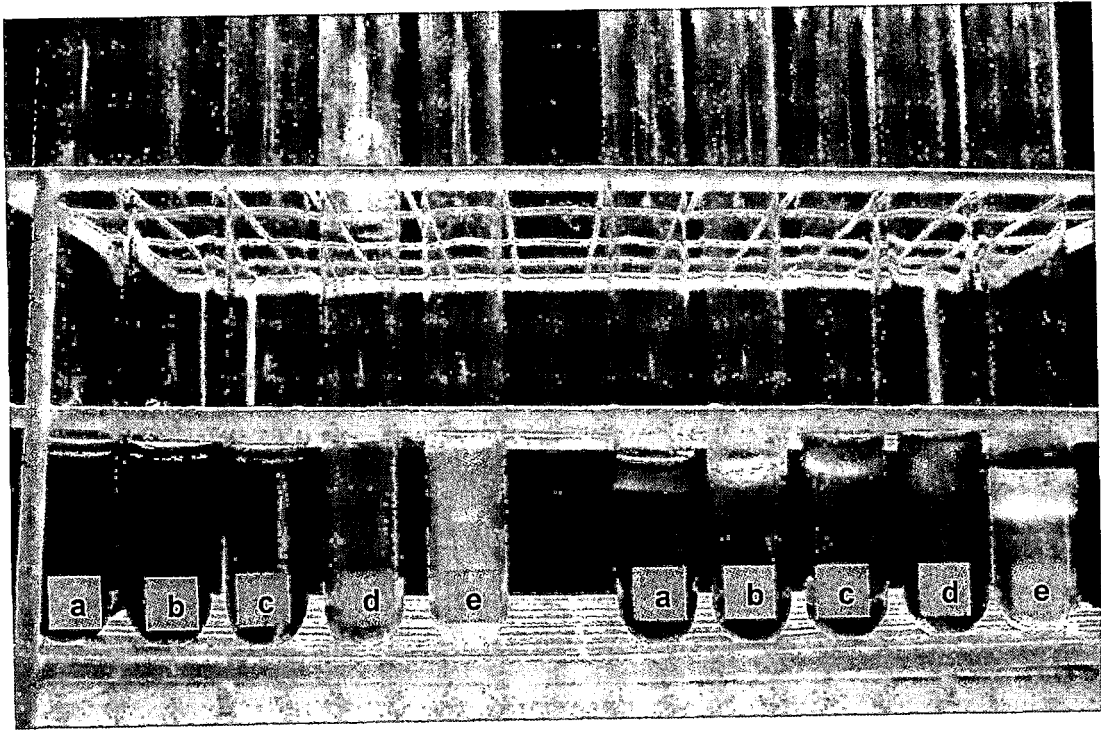
### **4.1 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de maíz**

En cinco medios semisólidos se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figura 44, Anexo 4).

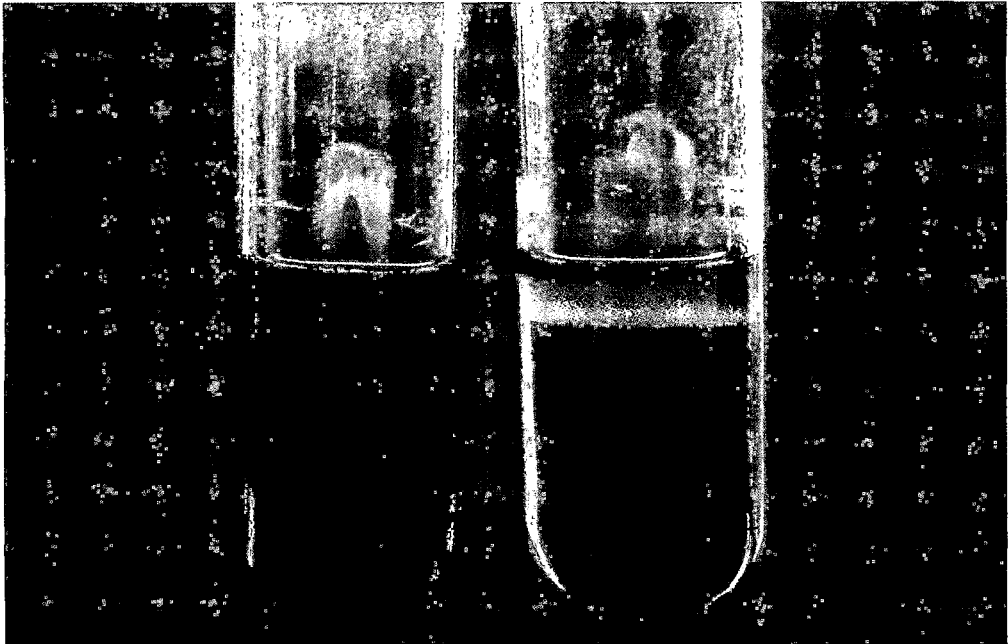
En el medio NFb, con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 45). La frecuencia de muestras de raíces de maíz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 68,5% después de la siembra, así como 55,5; 53,7 y 48,1% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 46).

En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al verde azulado y verde-amarillento (Figura 47). La frecuencia de muestras de raíces de maíz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 51,9% después de la siembra, así como 42,6; 37,0 y 33,3% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 48).

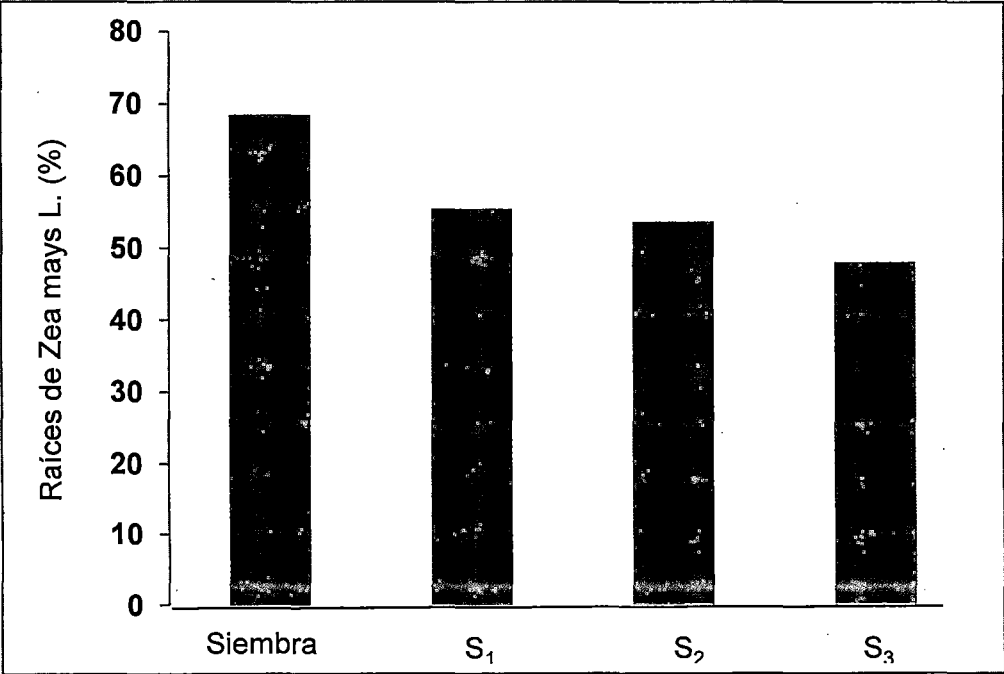
En el medio LGI-P, con un color inicial verde-amarillento, se observó viraje del indicador al amarillo y verde (Figura 49). La frecuencia de muestras de raíces de maíz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 35,2 % después de la siembra, así como 29,6; 27,8 y 24,1% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 50).



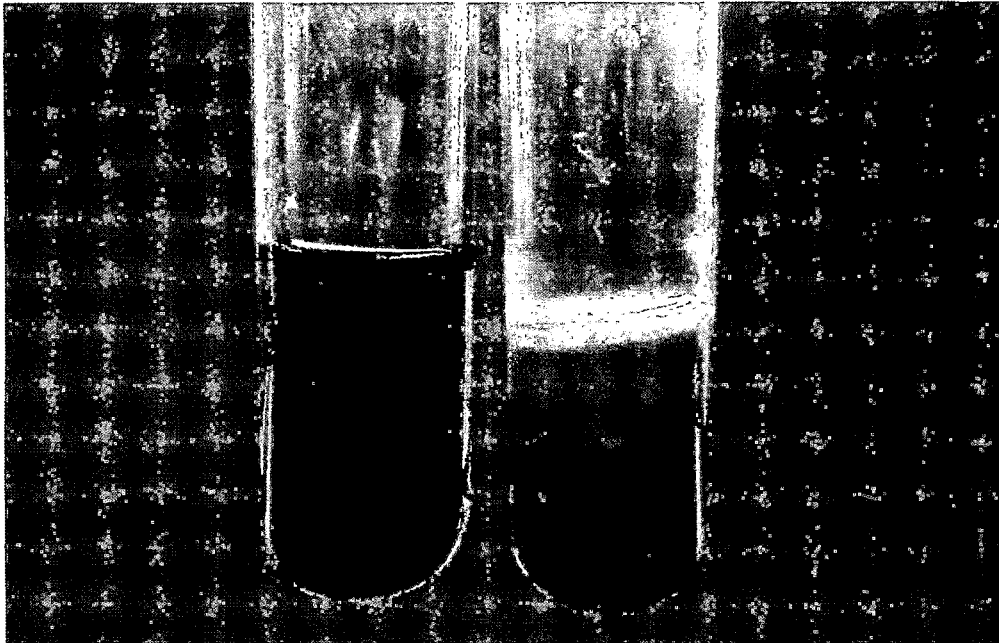
**Figura 44.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI (b), LGI-P (c), JNFb (d), JMV (e).



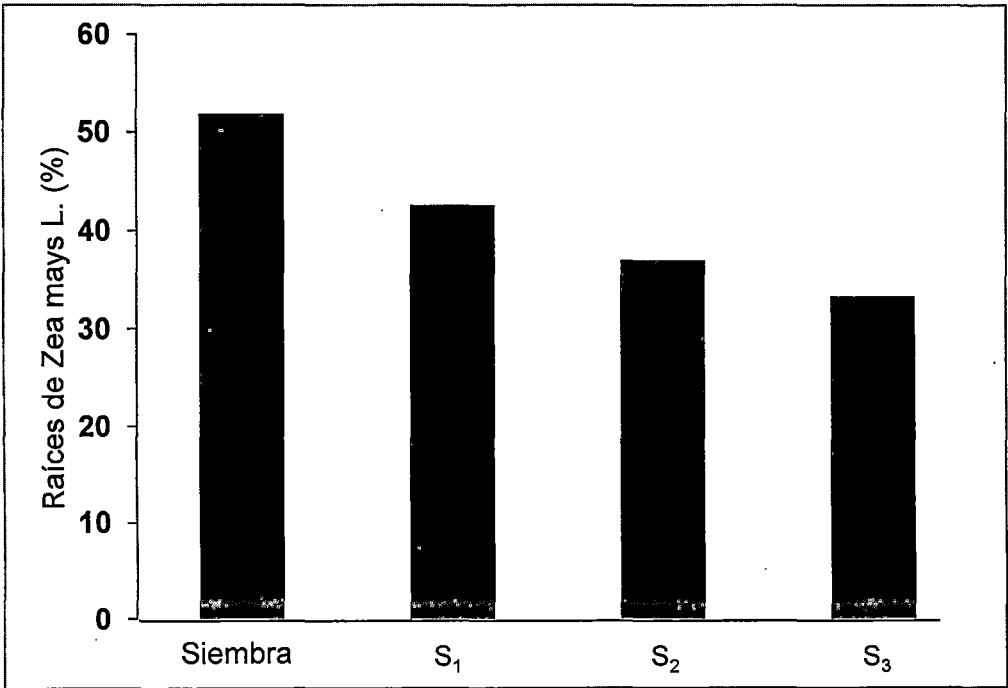
**Figura 45.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio NFb.



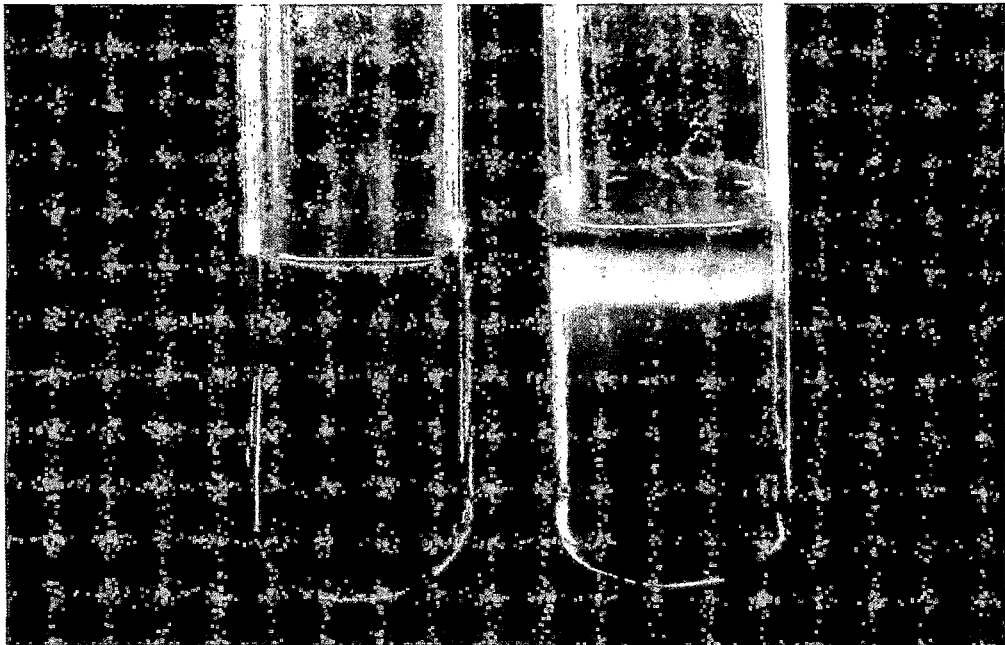
**Figura 46.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



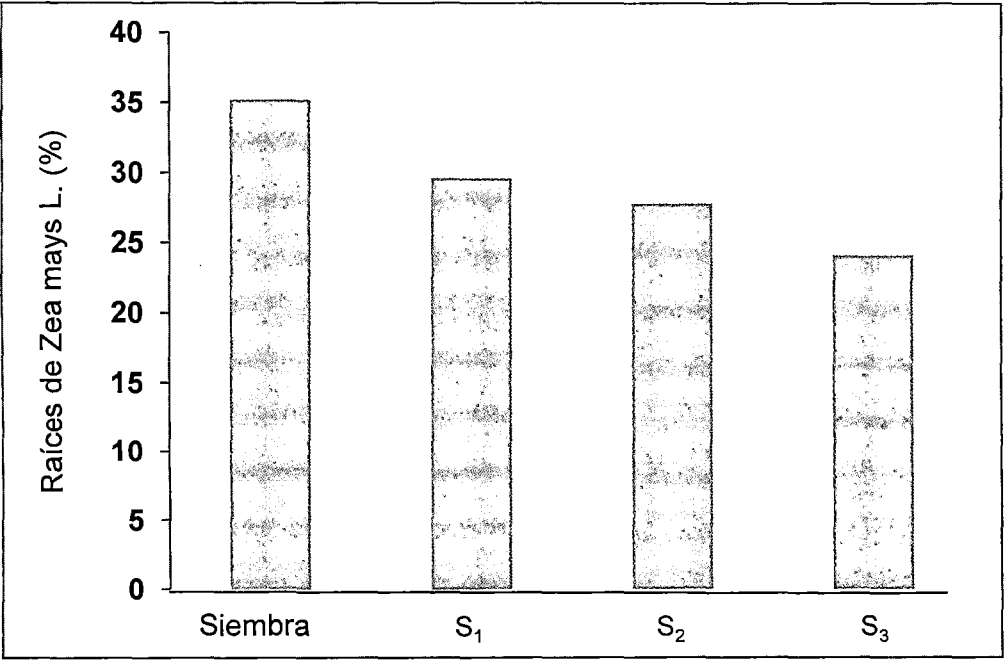
**Figura 47.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio LGI.



**Figura 48.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



**Figura 49.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio LGI-P.



**Figura 50.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014.

En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste azulado (Figura 51). La frecuencia de bacterias de muestras de raíces positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 35,2 % después de la siembra, así como 29,6; 27,8 y 18,5 % después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 52).

En el medio JMV con un color inicial amarillo-opaco, no se observó viraje del indicador, pero si formación de película (Figura 53). La frecuencia de muestras de raíces de maíz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 27,8 % después de la siembra, así como 22,2; 18,5 y 18,5 % después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 54).

La frecuencia de raíces de maíz con bacterias fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue de 48,1 % en NFb; 33,3 % en LGI; 24,1 % en LGI-P, así como 18,5 % en JNFb y JMV, respectivamente (Figura 55). En el aislamiento se obtuvieron 132 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno cuya procedencia correspondió al 30,3 % en NFb; 23,5 % en LGI; 18,2 % en LGI-P; 14,4 % en JNFb y 13,6 % en JMV (Figura 56).

El género *Azospirillum* fue identificado en el 87,5 % de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb y en el 80,6 % de LGI (Figuras 57, 58). *Gluconacetobacter* se identificó en el 41,6 % de bacterias aisladas en LGI-P (Figura 59), *Herbaspirillum* en el 31,6 % de bacterias aisladas en JNFb (Figura 60) y *Burkholderia* en el 17,0% de bacterias aisladas en JMV (Figura 61). De esta manera, la frecuencia de estas bacterias en las muestras de raíces de maíz fue 63,0% para *Azospirillum*, 18,5% para *Gluconacetobacter*, 14,8% para *Herbaspirillum* y 5,6% para *Burkholderia* spp. (Figura 62).

#### **4.2 Características fenotípicas de bacterias endófitas diazótrofes**

Las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* se observaron como bacilos pleomórficos, Gram negativos, positivos en las pruebas de catalasa, oxidasa, utilización del ácido como fuente de Carbono para la fijación de nitrógeno y presencia de gránulos de PHA (Tabla 7, figuras 63, 64, 65, 66).

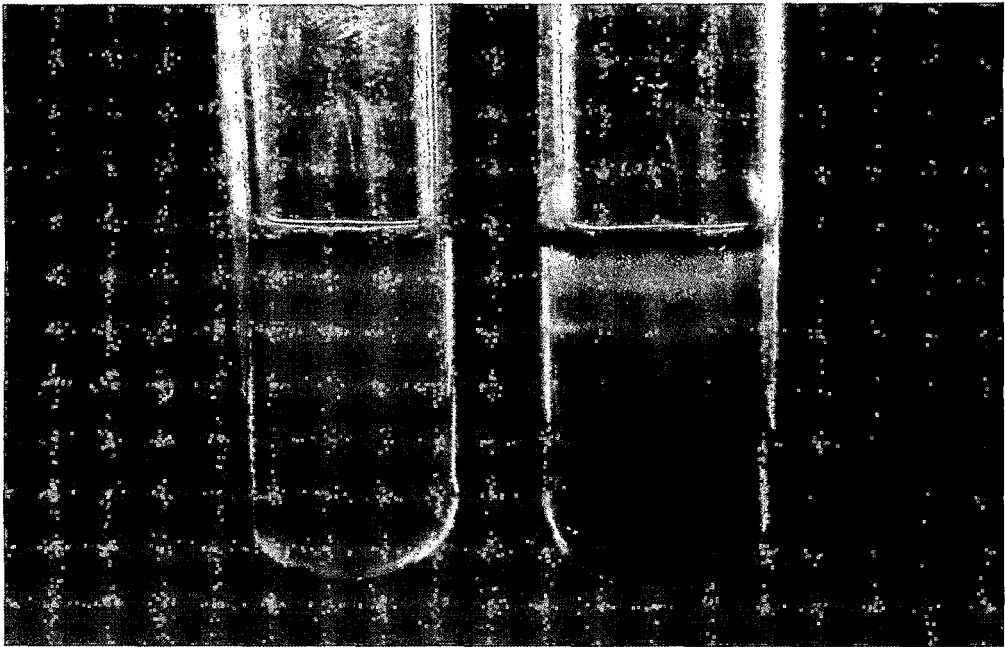


Figura 51. Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazotróficas en medio JNFb.

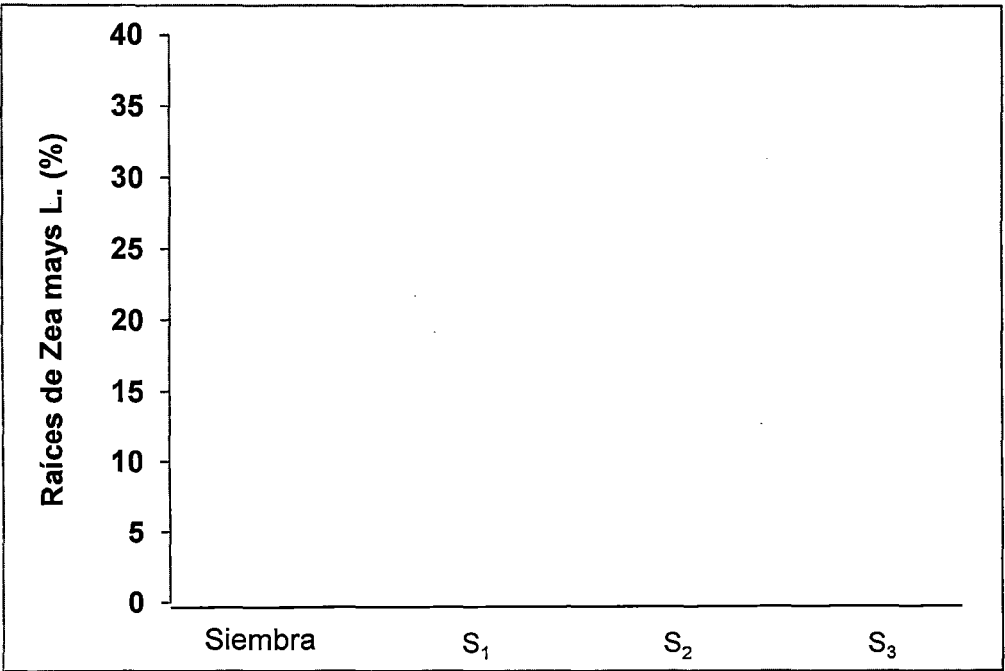
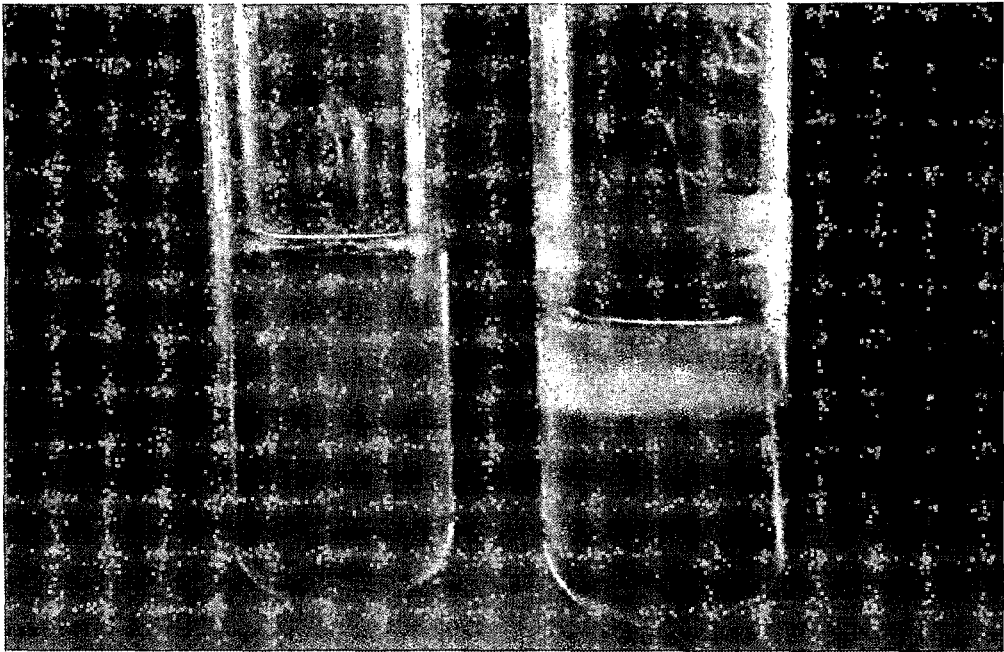
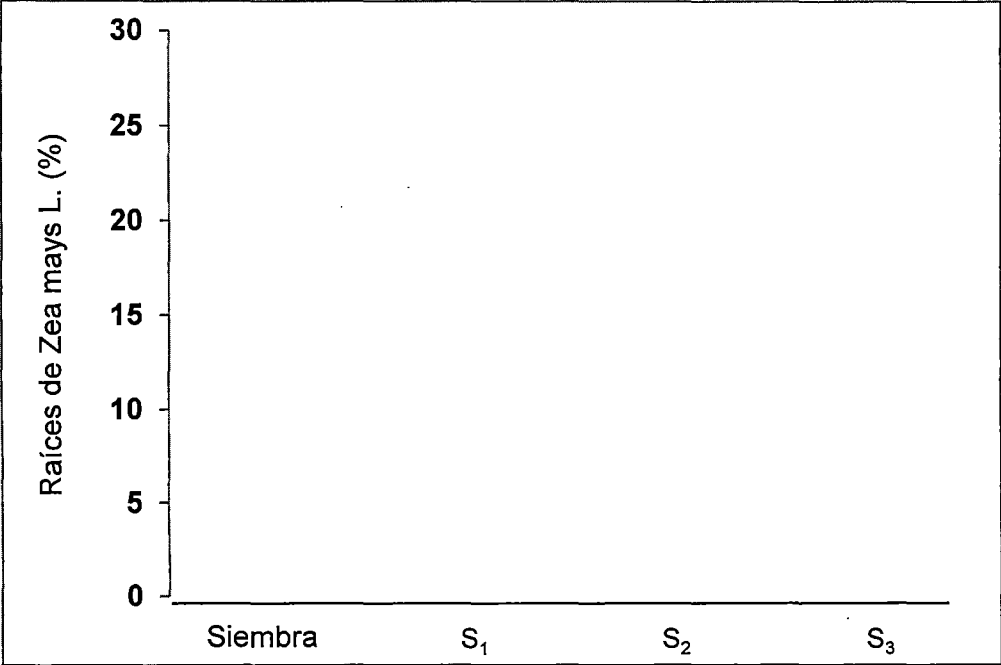


Figura 52. Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.

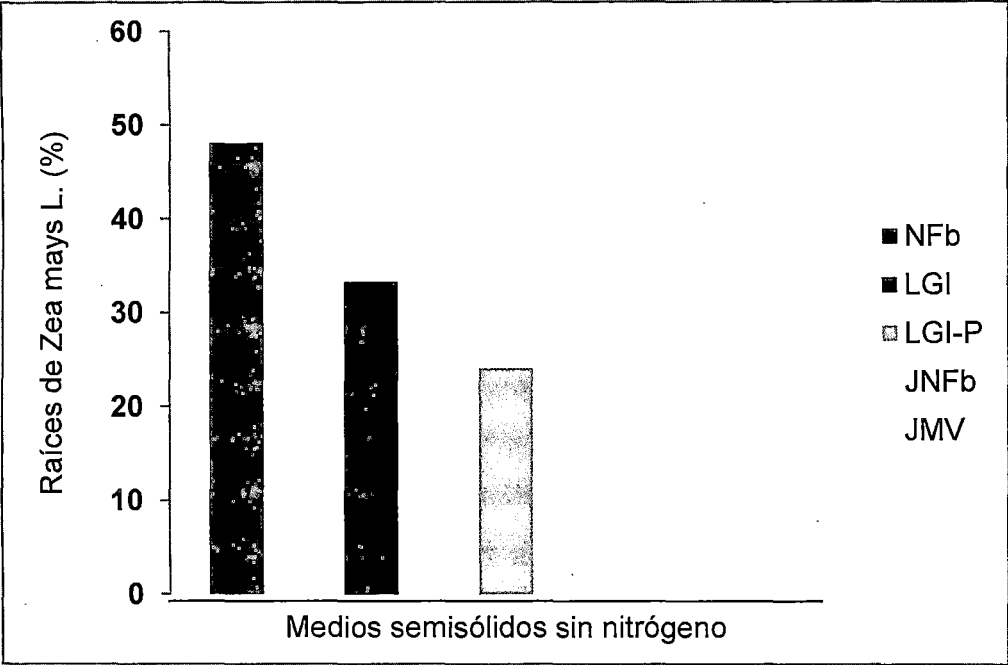




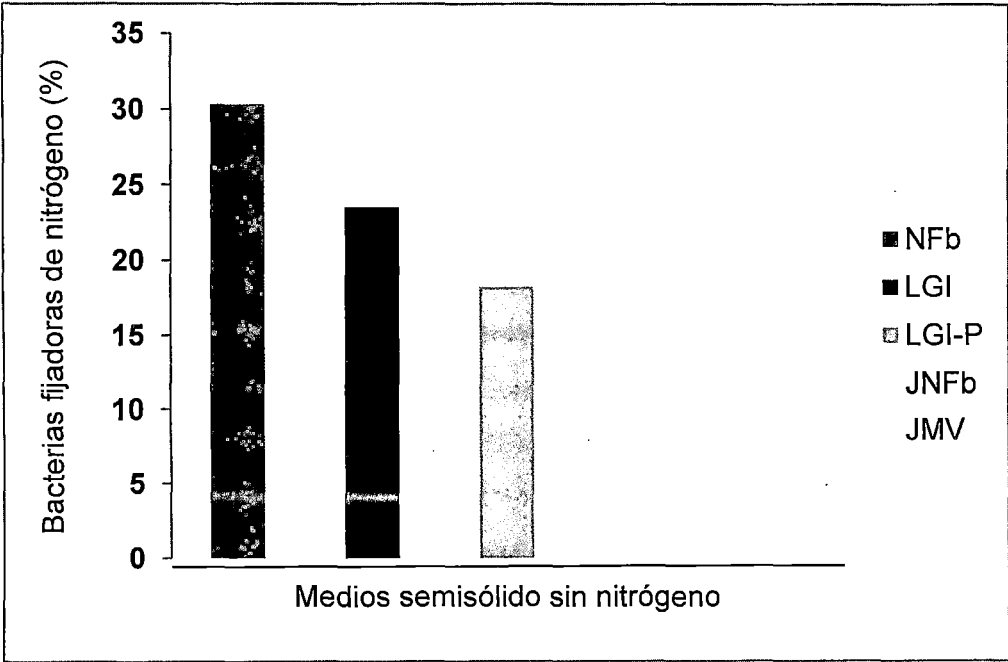
**Figura 53.** Película bacteriana por bacterias diazótrofes en medio JMV.



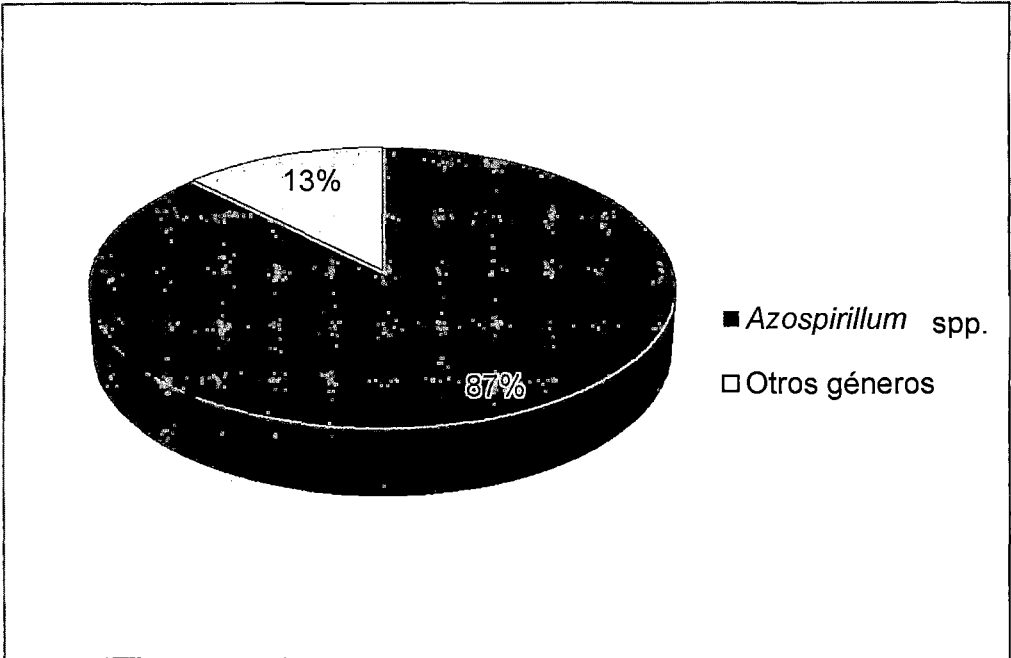
**Figura 54.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



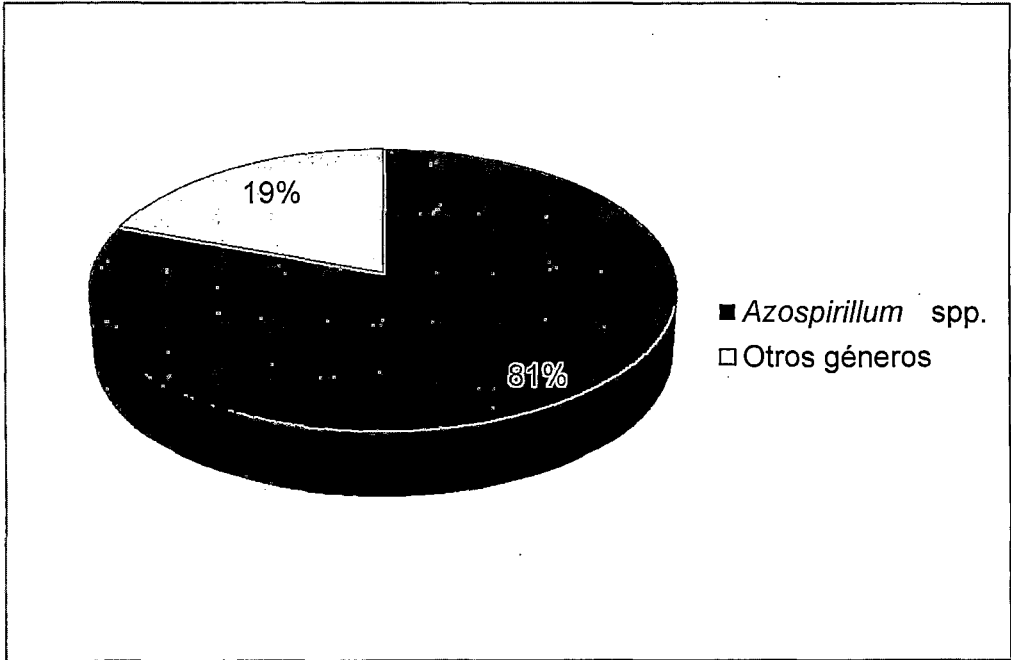
**Figura 55.** Frecuencia de raíces de *Zea mays* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.



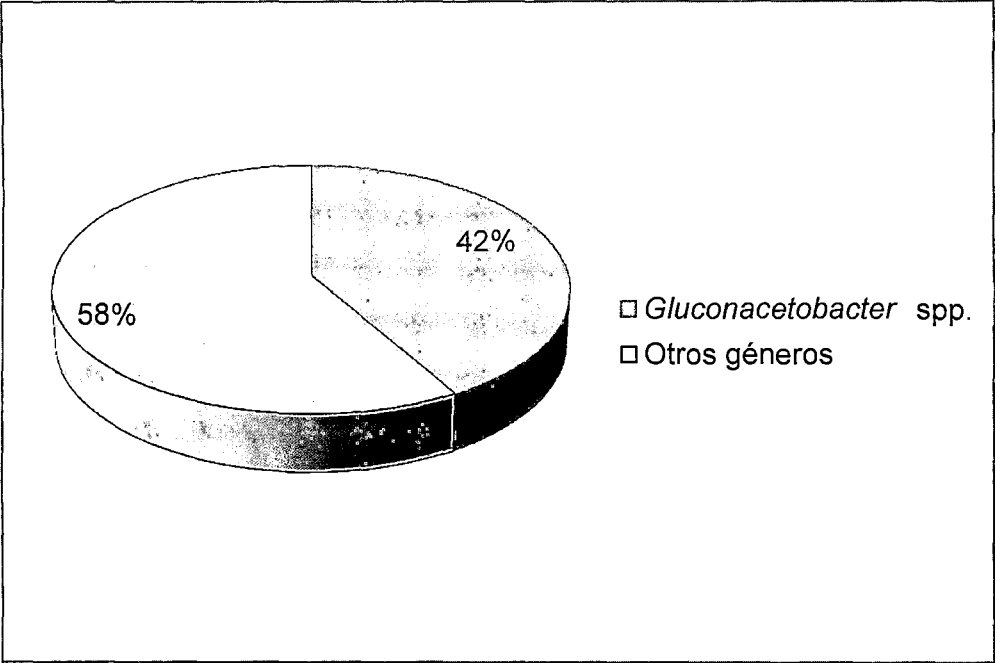
**Figura 56.** Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFb, LGI, LGI-P, JNFb, JMV.



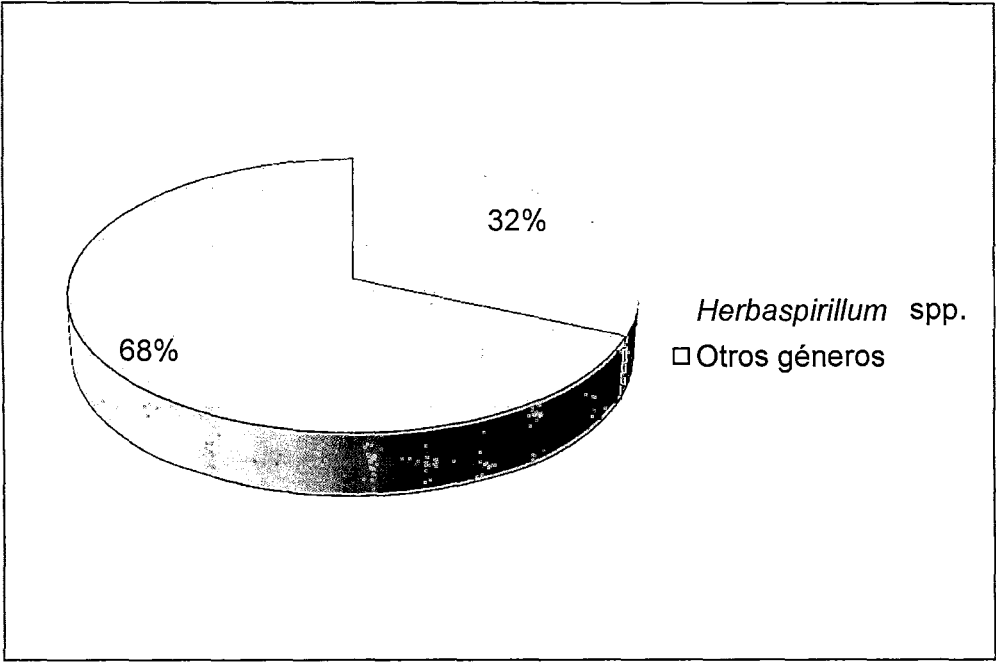
**Figura 57.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb.



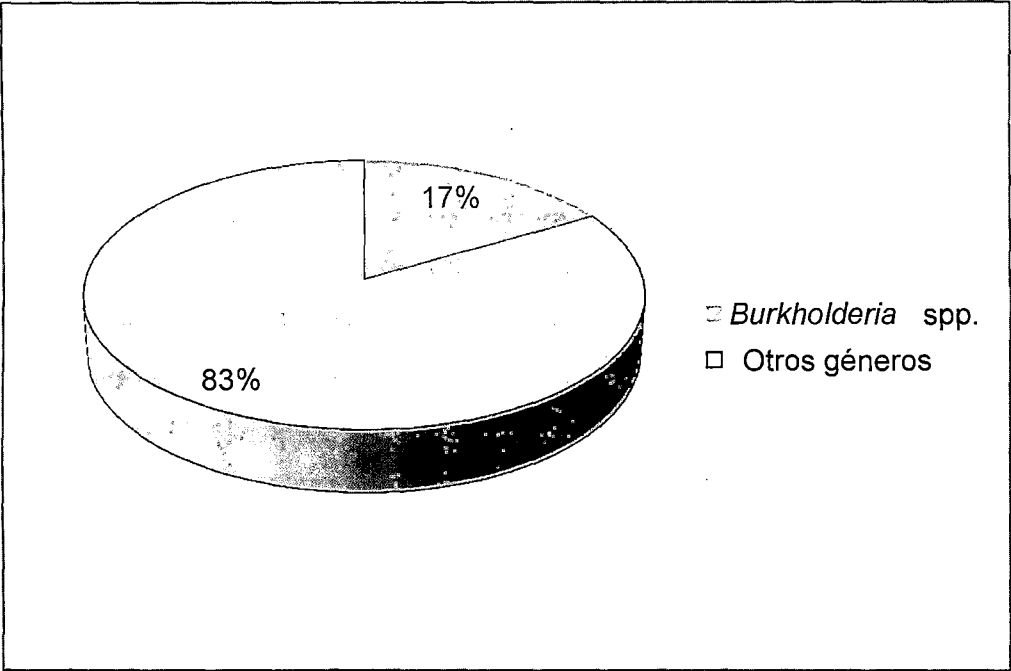
**Figura 58.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en LGI.



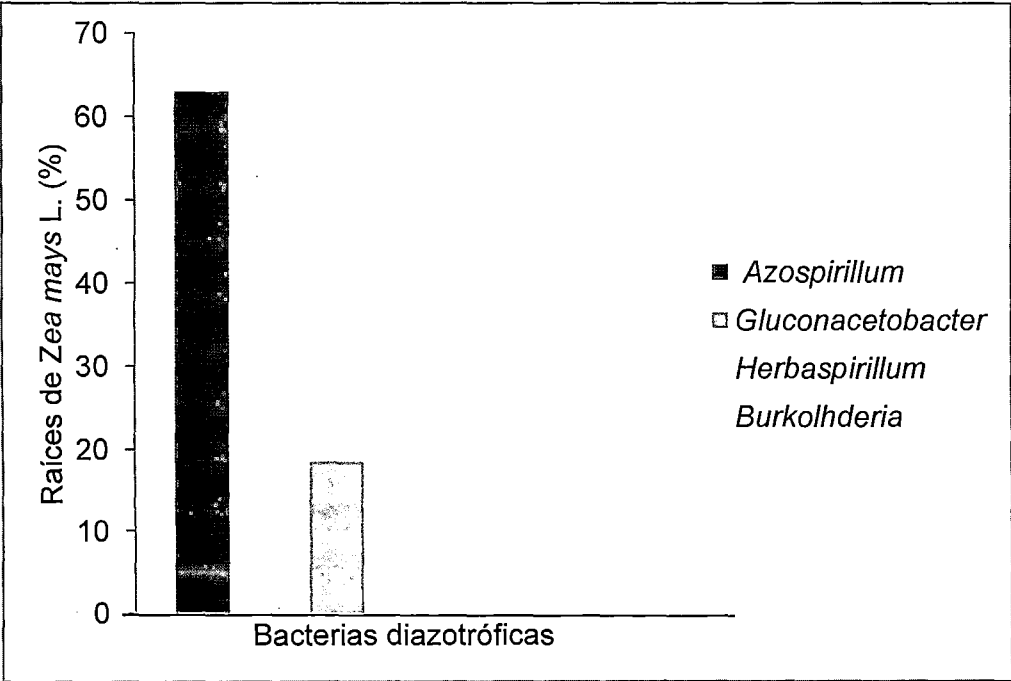
**Figura 59.** Frecuencia de *Gluconacetobacter* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en LGI-P.



**Figura 60.** Frecuencia de *Herbaspirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JNFb



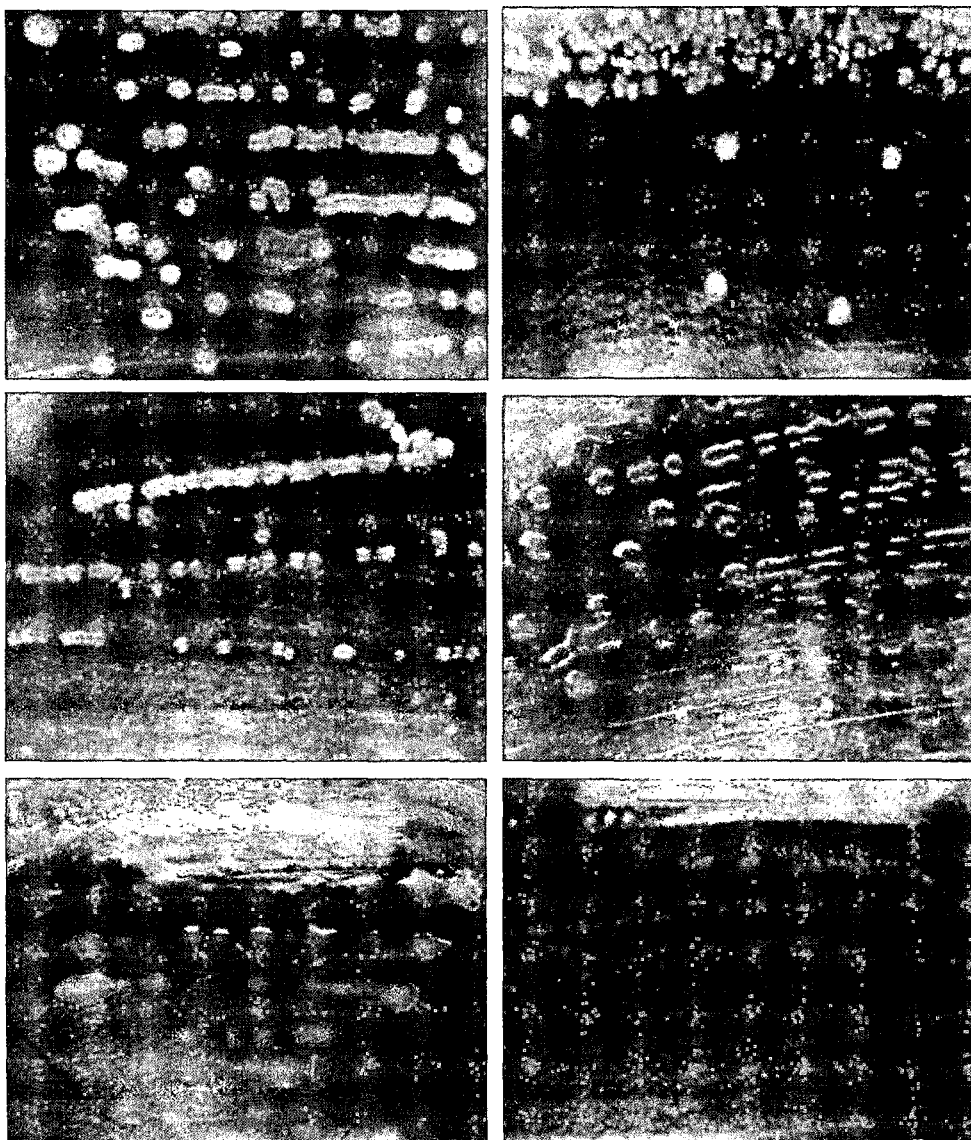
**Figura 61.** Frecuencia *Burkholderia* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JMV.



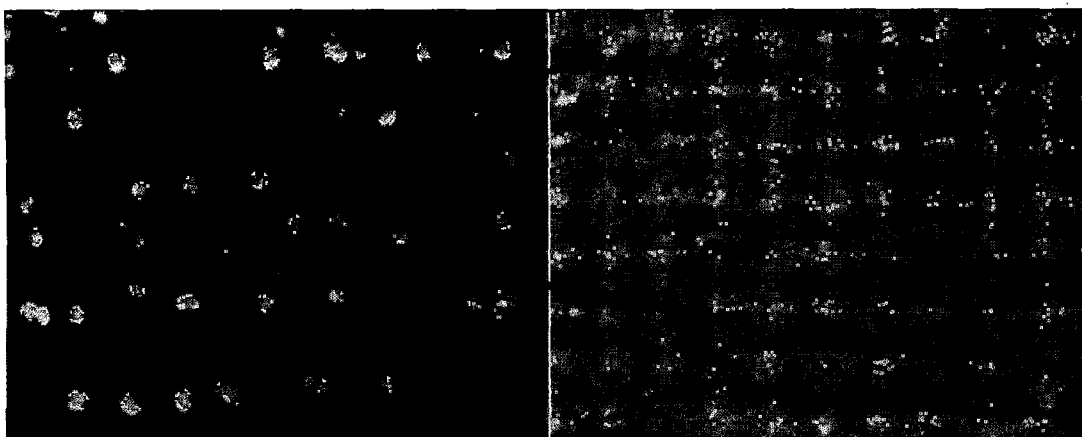
**Figura 62.** Frecuencia de *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* en raíces de *Zea mays* L., en Lambayeque, 2014.

**Tabla 7.** Características macroscópicas de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Zea mays* L., en Lambayeque, 2014

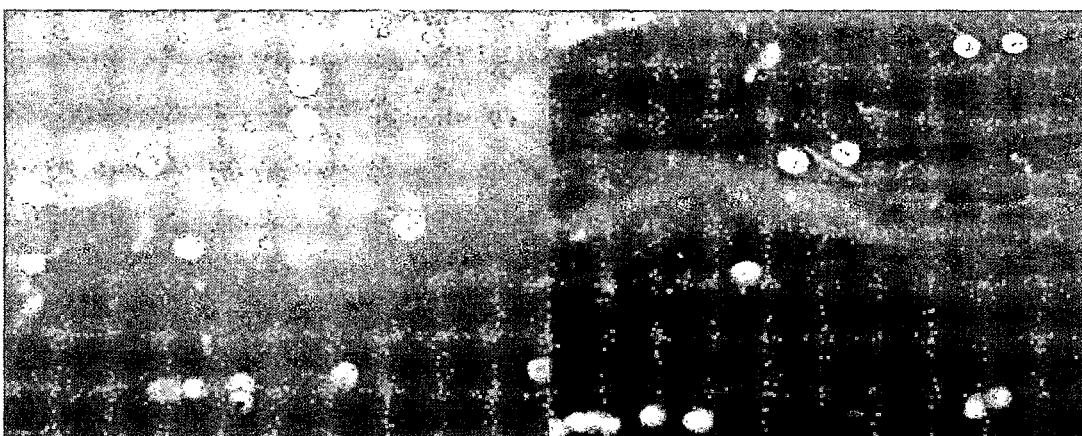
| Características | Azospirillum<br>NFB | Azospirillum<br>LGI | Herbaspirillum<br>JNFB | Gluconoacetobacter<br>LGI-P | Burkholderia<br>JMV               |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Tamaño          | Mediano             | Mediano             | Mediano                | Mediano                     | Grande                            |
| Forma           | Circular, Irregular | Circular, Irregular | Circular               | Circular                    | Grande                            |
| Bordes          | Enteros             | Enteros             | Enteros                | Enteros                     | Enteros                           |
| Elevación       | Convexas            | Convexas            | Convexas               | Convexas                    | Convexas                          |
| Centro          | No diferenciado     | No diferenciado     | Diferenciado, celeste  | Diferenciado, anaranjado    | Diferenciado<br>amarillo, intenso |
| Aspecto         | Opacas, brillantes  | Opacas, brillantes  | Brillantes             | Brillantes                  | Brillantes mucosas                |
| Color           | Blancas, azules     | Blancas, cremosas   | Celestes               | Amarillas anaranjadas       | Amarillas                         |



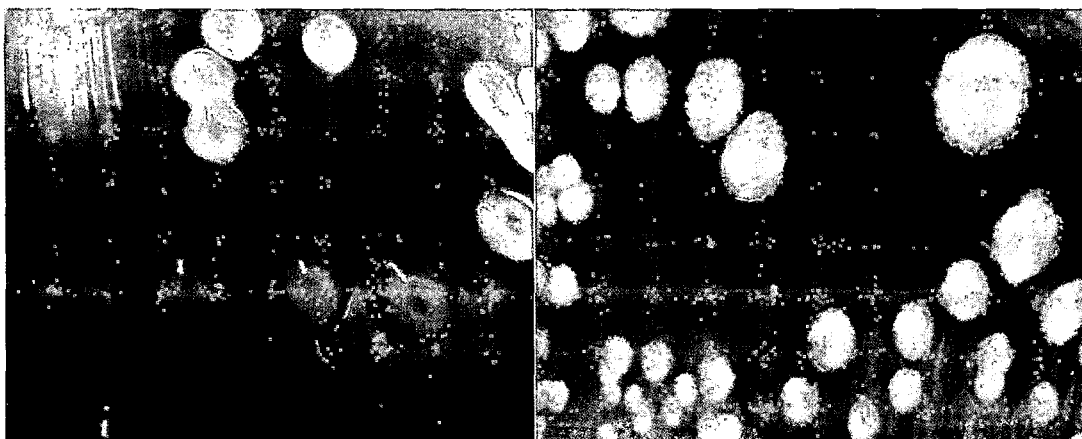
**Figura 63.** Observación macroscópica de colonias de *Azospirillum* spp. en medio NFb sólido.



**Figura 64.** Observación macroscópica de colonias de *Herbaspirillum* spp. en medio JNFb sólido



**Figura 65.** Observación macroscópica de colonias de *Gluconacetobacter* spp. en medio LGI-P sólido.



**Figura 66.** Observación macroscópica de colonias *Burkholderia* spp. en medio JMV sólido.



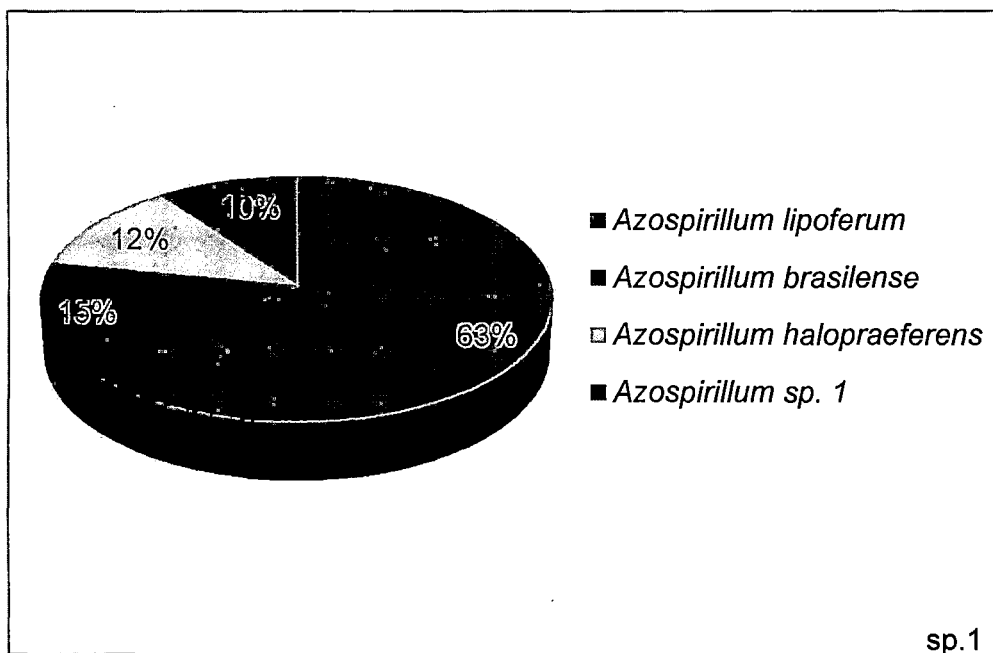
Las pruebas mencionadas, junto al requerimiento de biotina, tolerancia a 3 % NaCl, hidrólisis de la urea y gelatina, reducción de nitratos y utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, identificaron (Figura 67 a 72) *A. lipoferum* (63,0%), *A. brasilense* (15,3%) y *A. halopraeferens* (11,7%) y *Azospirillum* sp.1 (10,0 %). Los géneros restantes de las bacterias se identificaron por la utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno, así como por el crecimiento en caldo NFb, hidrólisis de la urea para *Herbaspirillum* (Figura 73); hidrólisis de la urea y gelatina y almidón y reducción de nitratos para *Gluconoacetobacter*, hidrólisis de la urea y gelatina, descarboxilación de la lisina y resistencia a 300ug de polimixina B para *Burkholderia* spp. (Figuras 74, 75).

#### **4.3 Nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas nativas**

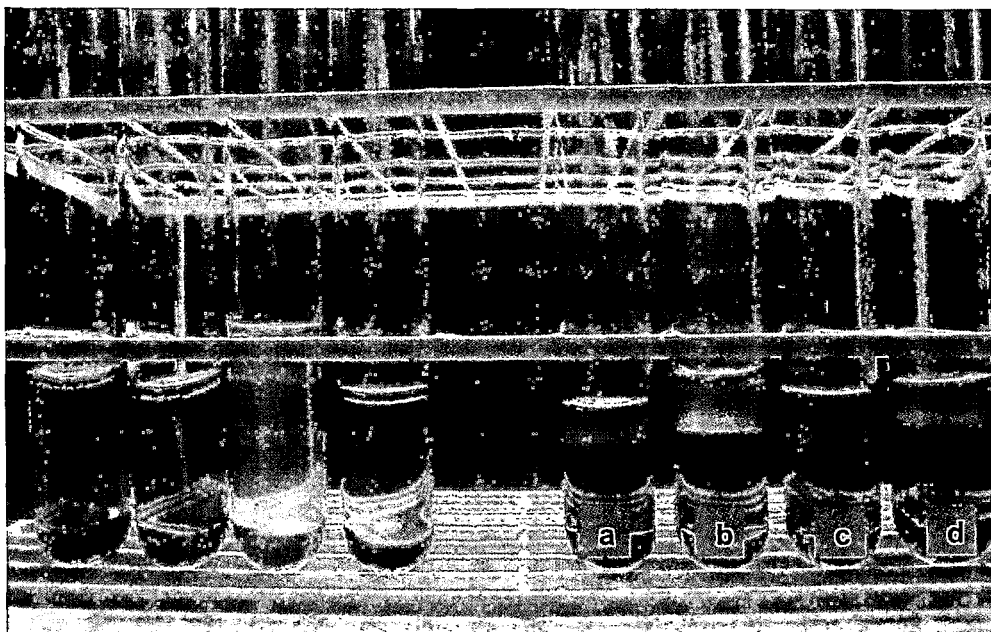
Todas las bacterias endófitas, fijaron nitrógeno *in vitro*, observándose una coloración azul en la cuantificación (Figura 76). Los valores de la concentración de amonio (Figura 77) no presentaron distribución normal, por lo que se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 5). Con *Azospirillum* spp. se alcanzaron 5,75–33,17ppm, correspondiendo los mayores valores a *A. lipoferum* 1, *Azospirillum* sp.1-1 y 1-2, sin diferencia significativas entre ellos (Tablas 8, 9). Los valores de *Herbaspirillum* spp. fueron 9,61–21,38ppm, correspondiendo al mayor valor a *Herbaspirillum* sp.EDH1, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tablas 10, 11). Con *Gluconacetobacter* spp. la concentración de amonio fue de 6,0–30,57ppm y el mayor valor fue de *Gluconacetobacter* sp.EDG1, con diferencias significativas frente a los otros tratamientos (Tablas 12, 13). Por su parte, *Burkholderia* spp. alcanzó 9,96 – 28,78ppm de amonio, siendo el mayor valor de *Burkholderia* sp.EDB1, diferenciándose significativamente de los otros tratamientos (Tablas 14, 15).

#### **4.4 Gen *nifH* identificado con bacterias endófitas diazotróficas nativas**

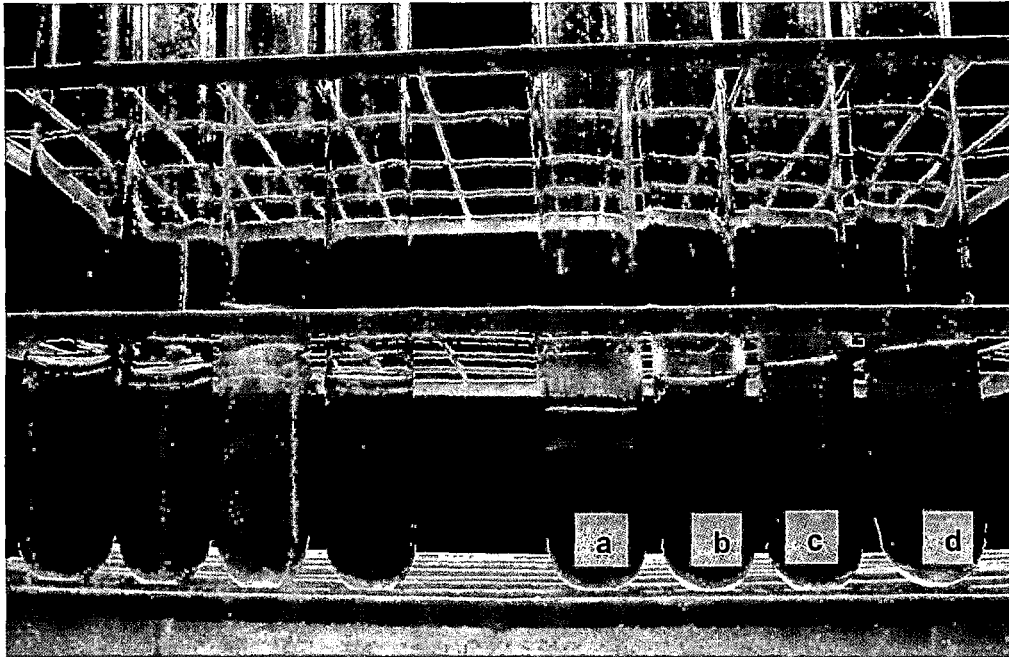
En *Azospirillum lipoferum*1, *Herbaspirillum* sp.EDH1, *Gluconacetobacter* sp. EDG1 y *Burkholderia* sp.EDB1 se identificó el gen *nifH*, obteniéndose un producto de 360 pares de bases en el gel de agarosa.



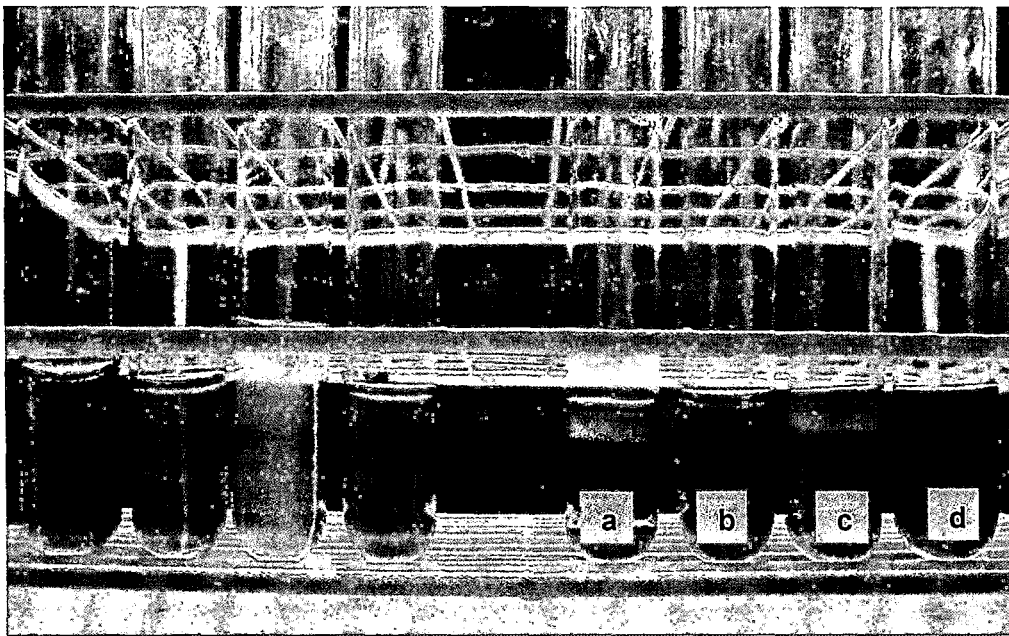
**Figura 67.** Frecuencia de especies de *Azospirillum* identificadas en raíces de *Zea mays* L . en Lambayeque, 2014.



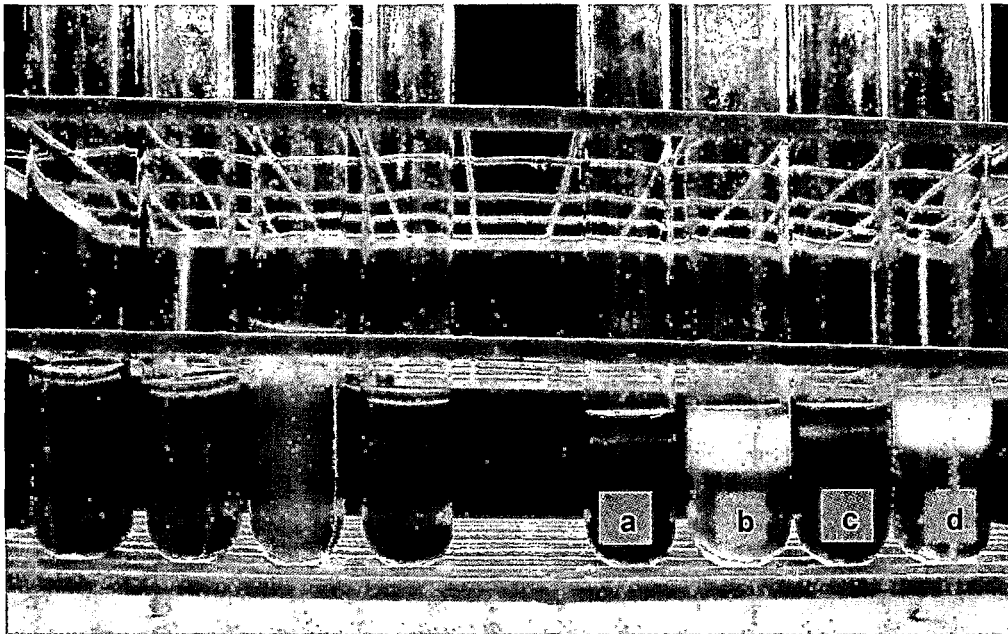
**Figura 68.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum lipoferum* fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).



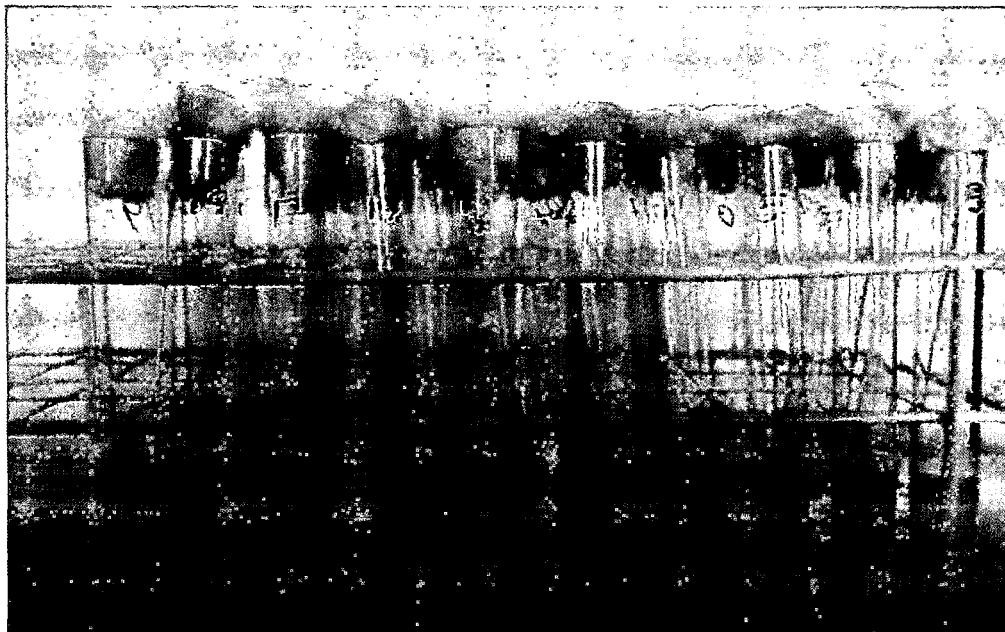
**Figura 69.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum brasilense* fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).



**Figura 70.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum halopraeferens* fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).



**Figura 71.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum* sp.1 fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).



**Figura 72.** Crecimiento de *Azospirillum* spp. nativas en caldo con cloruro de sodio.

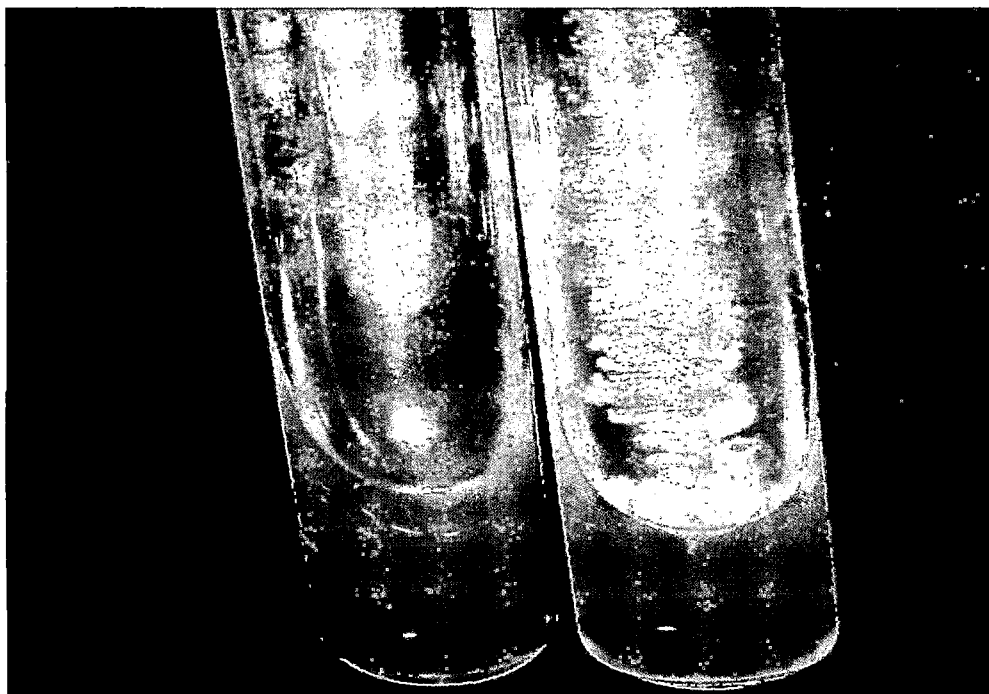


Figura 73. Prueba de hidrólisis de la urea por *Herbaspirillum* sp.

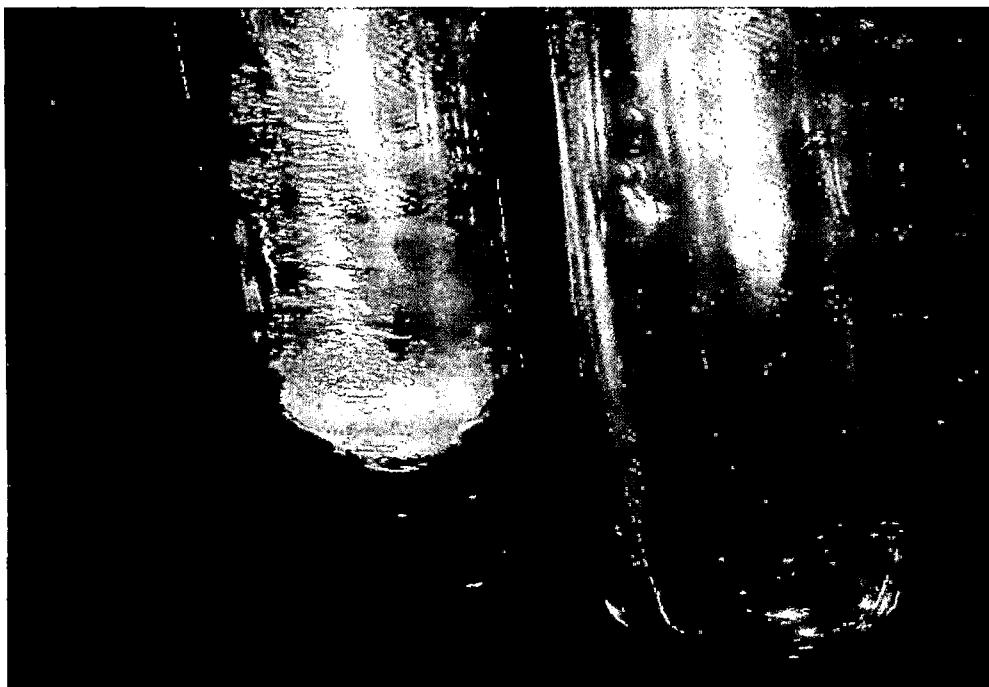
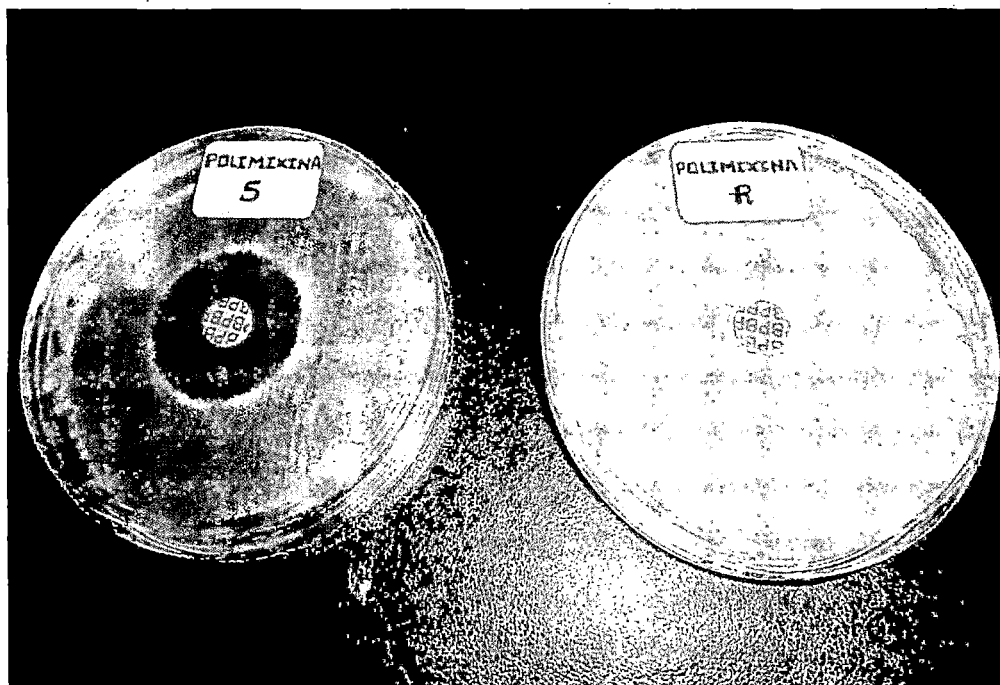
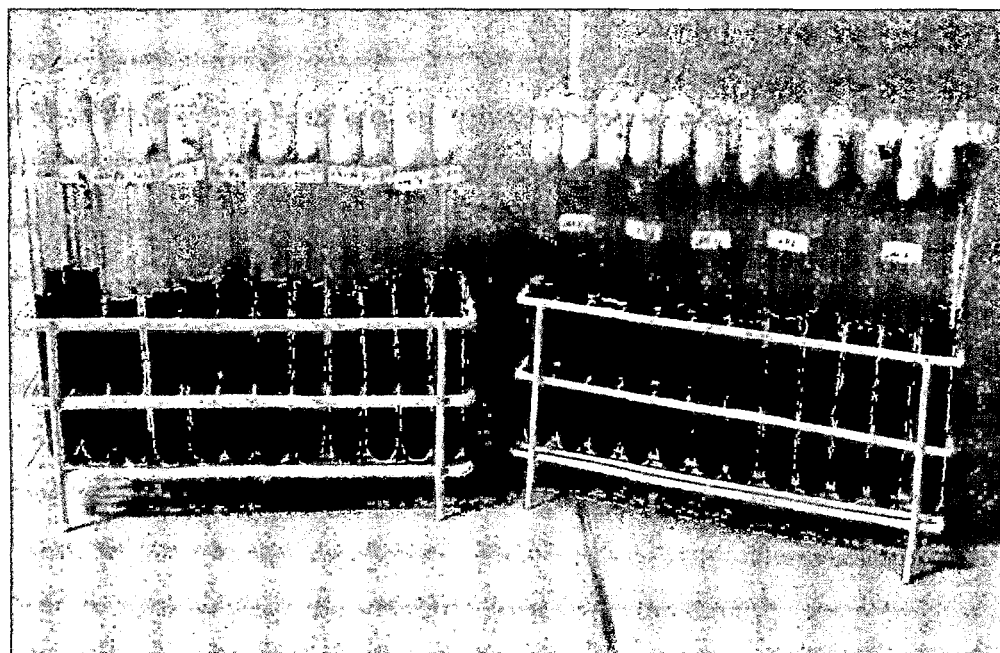


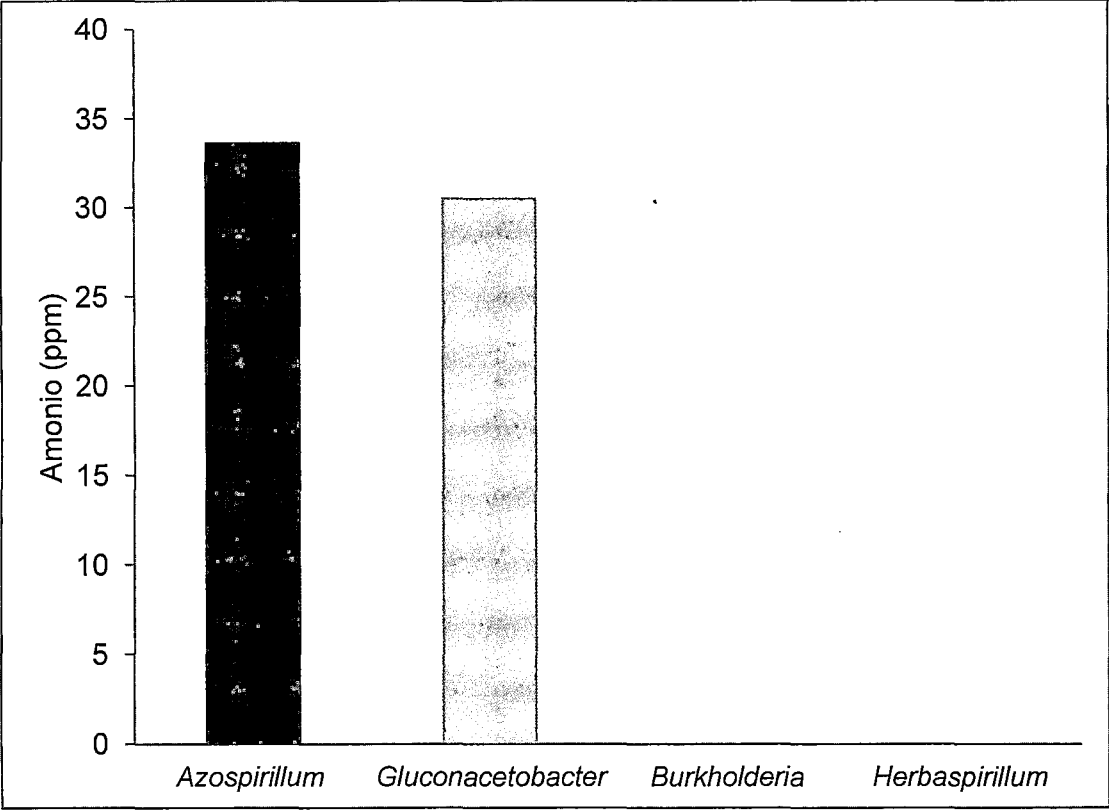
Figura 74. Prueba de descarboxilación de lisina por *Burkholderia* sp.



**Figura 75.** Resistencia de *Burkholderia* sp. a la polimixina B.



**Figura 76.** Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio.



**Figura 77.** Valores máximos (ppm) de nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014.

**Tabla 8.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azospirillum* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

| <i>Azospirillum</i> spp.   | Absorbancia corregida* | N (ppm) | <i>Azospirillum</i> spp.    | Absorbancia corregida | N (ppm) |
|----------------------------|------------------------|---------|-----------------------------|-----------------------|---------|
| <i>A. lipoferum</i> 1      | 1,84                   | 33,17   | <i>A. lipoferum</i> 14      | 0,92                  | 16,17   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-1 | 1,82                   | 32,68   | <i>A. lipoferum</i> 15      | 0,83                  | 14,59   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-2 | 1,80                   | 32,32   | <i>A. lipoferum</i> 16      | 0,79                  | 13,86   |
| <i>A. lipoferum</i> 2      | 1,78                   | 32,03   | <i>A. lipoferum</i> 17      | 0,78                  | 13,60   |
| <i>A. lipoferum</i> 3      | 1,75                   | 31,49   | <i>A. lipoferum</i> 18      | 0,74                  | 12,97   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-3 | 1,77                   | 31,84   | <i>A. lipoferum</i> 19      | 0,73                  | 12,77   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-4 | 1,71                   | 30,69   | <i>A. lipoferum</i> 20      | 0,72                  | 12,60   |
| <i>A. halopraeferens</i> 1 | 1,66                   | 29,88   | <i>A. lipoferum</i> 21      | 0,71                  | 12,38   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-5 | 1,59                   | 28,48   | <i>A. halopraeferens</i> 6  | 0,70                  | 12,21   |
| <i>A. brasilense</i> 1     | 1,57                   | 28,05   | <i>A. lipoferum</i> 22      | 0,69                  | 12,07   |
| <i>A. brasilense</i> 2     | 1,56                   | 27,97   | <i>A. brasilense</i> 8      | 0,67                  | 11,59   |
| <i>A. brasilense</i> 3     | 1,51                   | 26,94   | <i>A. lipoferum</i> 23      | 0,65                  | 11,27   |
| <i>A. brasilense</i> 4     | 1,50                   | 26,87   | <i>A. lipoferum</i> 24      | 0,62                  | 10,74   |
| <i>A. lipoferum</i> 4      | 1,50                   | 26,84   | <i>A. lipoferum</i> 25      | 0,61                  | 10,55   |
| <i>A. halopraeferens</i> 2 | 1,47                   | 26,40   | <i>A. lipoferum</i> 26      | 0,60                  | 10,35   |
| <i>A. halopraeferens</i> 3 | 1,46                   | 26,17   | <i>A. brasilense</i> 9      | 0,54                  | 9,26    |
| <i>A. halopraeferens</i> 4 | 1,41                   | 25,20   | <i>A. lipoferum</i> 27      | 0,53                  | 9,04    |
| <i>A. lipoferum</i> 5      | 1,35                   | 24,18   | <i>A. lipoferum</i> 28      | 0,52                  | 8,90    |
| <i>A. lipoferum</i> 6      | 1,26                   | 22,49   | <i>A. lipoferum</i> 29      | 0,51                  | 8,78    |
| <i>A. lipoferum</i> 7      | 1,25                   | 22,27   | <i>A. lipoferum</i> 30      | 0,50                  | 8,58    |
| <i>A. halopraeferens</i> 5 | 1,22                   | 21,65   | <i>A. lipoferum</i> 31      | 0,49                  | 8,39    |
| <i>A. brasilense</i> 5     | 1,20                   | 21,38   | <i>A. lipoferum</i> 32      | 0,48                  | 8,17    |
| <i>A. lipoferum</i> 8      | 1,19                   | 21,09   | <i>A. lipoferum</i> 33      | 0,44                  | 7,44    |
| <i>A. lipoferum</i> 9      | 1,15                   | 20,37   | <i>A. lipoferum</i> 34      | 0,43                  | 7,41    |
| <i>A. lipoferum</i> 10     | 1,11                   | 19,74   | <i>A. lipoferum</i> 35      | 0,42                  | 7,15    |
| <i>A. lipoferum</i> 11     | 1,09                   | 19,44   | <i>A. lipoferum</i> 36      | 0,41                  | 8,85    |
| <i>A. lipoferum</i> 12     | 1,07                   | 18,90   | <i>A. halopraeferens</i> 7  | 0,41                  | 6,75    |
| <i>A. brasilense</i> 6     | 0,97                   | 17,08   | <i>A. lipoferum</i> 37      | 0,40                  | 6,56    |
| <i>A. lipoferum</i> 13     | 0,95                   | 16,76   | <i>A. lipoferum</i> 38      | 0,38                  | 6,24    |
| <i>A. brasilense</i> 7     | 0,93                   | 16,37   | <i>Azospirillum</i> sp. 1-6 | 0,35                  | 5,75    |

\*Absorbancia control = 0,202

Promedio de tres repeticiones



**Tabla 9.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L.

| <i>Azospirillum</i> spp.   | Amonio (ppm) | Significancia ( $\alpha = 0,05$ )           |
|----------------------------|--------------|---|
| <i>A. lipoferum</i> 1      | 33,17        | a   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-1 | 32,68        | a b   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-2 | 32,32        | a b c                                       |
| <i>A. lipoferum</i> 2      | 32,04        | a b c                                       |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-3 | 31,84        | a b c d                                     |
| <i>A. lipoferum</i> 3      | 31,49        | a b c d e                                   |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-4 | 30,69        | a b c d e f                                 |
| <i>A. halopraeferens</i> 1 | 29,88        | a b c d e f g                               |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-5 | 28,48        | a b c d e f g h                             |
| <i>A. brasilense</i> 1     | 28,05        | a b c d e f g h i                           |
| <i>A. brasilense</i> 2     | 27,97        | a b c d e f g h i                           |
| <i>A. brasilense</i> 3     | 26,94        | a b c d e f g h i j                         |
| <i>A. brasilense</i> 4     | 26,87        | a b c d e f g h i j                         |
| <i>A. lipoferum</i> 4      | 26,84        | a b c d e f g h i j                         |
| <i>A. halopraeferens</i> 2 | 26,40        | a b c d e f g h i j k                       |
| <i>A. halopraeferens</i> 3 | 26,17        | a b c d e f g h i j k l                     |
| <i>A. halopraeferens</i> 4 | 25,20        | a b c d e f g h i j k l m                   |
| <i>A. lipoferum</i> 5      | 24,18        | a b c d e f g h i j k l m                   |
| <i>A. lipoferum</i> 6      | 22,49        | a b c d e f g h i j k l m n                 |
| <i>A. lipoferum</i> 7      | 22,27        | a b c d e f g h i j k l m n o               |
| <i>A. halopraeferens</i> 5 | 21,65        | a b c d e f g h i j k l m n o p             |
| <i>A. brasilense</i> 5     | 21,38        | a b c d e f g h i j k l m n o p q           |
| <i>A. lipoferum</i> 8      | 21,09        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r         |
| <i>A. lipoferum</i> 9      | 20,37        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r s       |
| <i>A. lipoferum</i> 10     | 19,74        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r s       |
| <i>A. lipoferum</i> 11     | 19,44        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t     |
| <i>A. lipoferum</i> 12     | 18,90        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u   |
| <i>A. brasilense</i> 6     | 17,08        | a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v |
| <i>A. lipoferum</i> 13     | 16,76        | b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v   |

Continuación...

| <i>Azospirillum</i> spp.   | Amonio<br>(ppm) | Significancia<br>( $\alpha = 0,05$ ) |
|----------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| <i>A. brasilense</i> 7     | 16,37           | cdefghijklmnopqrstuvw                |
| <i>A. lipoferum</i> 14     | 16,17           | cdefghijklmnopqrstuvw                |
| <i>A. lipoferum</i> 15     | 14,59           | defghijklmnopqrstuvw                 |
| <i>A. lipoferum</i> 16     | 13,86           | efghijklmnopqrstuvw                  |
| <i>A. lipoferum</i> 17     | 13,60           | fghijklmnopqrstuvw                   |
| <i>A. lipoferum</i> 18     | 12,97           | ghijklmnopqrstuvw                    |
| <i>A. lipoferum</i> 19     | 12,77           | hijklmnopqrstuvw                     |
| <i>A. lipoferum</i> 20     | 12,60           | ijklmnopqrstuvw                      |
| <i>A. lipoferum</i> 21     | 12,38           | ijklmnopqrstuvw                      |
| <i>A. halopraeferens</i> 6 | 12,21           | jklmnopqrstuvw                       |
| <i>A. lipoferum</i> 22     | 12,07           | jklmnopqrstuvw                       |
| <i>A. brasilense</i> 8     | 11,59           | klmnopqrstuvw                        |
| <i>A. lipoferum</i> 23     | 11,27           | klmnopqrstuvw                        |
| <i>A. lipoferum</i> 24     | 10,74           | lmnopqrstuvw                         |
| <i>A. lipoferum</i> 25     | 10,55           | mnopqrstuvw                          |
| <i>A. lipoferum</i> 26     | 10,35           | mnopqrstuvw                          |
| <i>A. brasilense</i> 9     | 9,26            | nopqrstuvw                           |
| <i>A. lipoferum</i> 27     | 9,04            | opqrstuvw                            |
| <i>A. lipoferum</i> 28     | 8,90            | pqrstuvw                             |
| <i>A. lipoferum</i> 29     | 8,78            | qrstuvw                              |
| <i>A. lipoferum</i> 30     | 8,58            | qrstuvw                              |
| <i>A. lipoferum</i> 31     | 8,39            | rstuvw                               |
| <i>A. lipoferum</i> 32     | 8,17            | stuvw                                |
| <i>A. lipoferum</i> 33     | 7,44            | tuvw                                 |
| <i>A. lipoferum</i> 34     | 7,41            | uvw                                  |
| <i>A. lipoferum</i> 35     | 7,15            | uvw                                  |
| <i>A. lipoferum</i> 36     | 6,85            | vwx                                  |
| <i>A. halopraeferens</i> 7 | 6,75            | wx                                   |
| <i>A. lipoferum</i> 37     | 6,56            | wx                                   |
| <i>A. lipoferum</i> 38     | 6,24            | x                                    |
| <i>Azospirillum</i> sp.1-6 | 5,75            | x                                    |

**Tabla 10.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Herbaspirillum* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

| <i>Herbaspirillum</i> spp. | Absorbancia corregida | N (ppm) |
|----------------------------|-----------------------|---------|
| EDH1                       | 1,62                  | 21,38   |
| EDH2                       | 1,13                  | 19,98   |
| EDH3                       | 1,04                  | 18,41   |
| EDH4                       | 1,00                  | 17,83   |
| EDH5                       | 0,69                  | 11,92   |
| EDH6                       | 0,64                  | 11,03   |
| EDH7                       | 0,59                  | 10,12   |
| EDH8                       | 0,56                  | 9,61    |

Absorbancia control = 0,202  
 \* Promedio de tres repeticiones

**Tabla 11.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L.

| <i>Herbaspirillum</i> spp. | Amonio (ppm) | Significancia ( $\alpha = 0,05$ ) |
|----------------------------|--------------|-----------------------------------|
| EDH1                       | 21,38        | a                                 |
| EDH2                       | 19,98        | a b                               |
| EDH3                       | 18,41        | a b c                             |
| EDH4                       | 17,83        | a b c d                           |
| EDH5                       | 11,92        | b c d e                           |
| EDH6                       | 11,03        | c d e                             |
| EDH7                       | 10,12        | d e                               |
| EDH8                       | 9,61         | e                                 |

**Tabla 12.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Gluconacetobacter* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

| <i>Gluconacetobacter</i> spp | Absorbancia corregida | N (ppm) |
|------------------------------|-----------------------|---------|
| EDG1                         | 1,70                  | 30,57   |
| EDG2                         | 1,57                  | 28,17   |
| EDG3                         | 1,16                  | 20,69   |
| EDG4                         | 1,08                  | 19,22   |
| EDG5                         | 0,99                  | 17,46   |
| EDG6                         | 0,61                  | 10,50   |
| EDG7                         | 0,55                  | 9,41    |
| EDG8                         | 0,47                  | 7,84    |
| EDG9                         | 0,37                  | 5,99    |
| EDG10                        | 0,32                  | 5,15    |

Absorbancia control = 0,202  
 \* Promedio de tres repeticiones

**Tabla 13.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Gluconacetobacter* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L.

| <i>Gluconacetobacter</i> spp. | Amonio (ppm) | Significancia (α = 0,05) |
|-------------------------------|--------------|--------------------------|
| EDG1                          | 30,56        | a                        |
| EDG2                          | 28,17        | a b                      |
| EDG3                          | 20,68        | a b c                    |
| EDG4                          | 19,22        | a b c d                  |
| EDG5                          | 17,46        | a b c d e                |
| EDG6                          | 10,50        | b c d e f                |
| EDG7                          | 9,41         | c d e f                  |
| EDG8                          | 7,83         | d e f                    |
| EDG9                          | 5,99         | e f                      |
| EDG10                         | 5,14         | f                        |

**Tabla 14.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Burkholderia* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

| <i>Burkholderia</i> spp. | Absorbancia corregida | N (ppm) |
|--------------------------|-----------------------|---------|
| EDB1                     | 1,61                  | 28,78   |
| EDB2                     | 1,44                  | 25,83   |
| EDB3                     | 1,02                  | 18,41   |
| EDB4                     | 0,76                  | 13,32   |
| EDB5                     | 0,58                  | 9,96    |

Absorbancia control = 0,202  
 \* Promedio de tres repeticiones

**Tabla 15.** Prueba de Kruskal-Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. aisladas de raíces de *Zea mays* L.

| <i>Burkholderia</i> spp. | Amonio (ppm) | Significancia ( $\alpha = 0,05$ ) |
|--------------------------|--------------|-----------------------------------|
| EDB1                     | 28,74        | a                                 |
| EDB2                     | 25,83        | a b                               |
| EDB3                     | 18,08        | a b c                             |
| EDB4                     | 13,32        | b c                               |
| EDB5                     | 9,96         | c                                 |

## V. DISCUSIÓN

En muestras de raíces de maíz se aislaron bacterias endófitas diazotróficas coincidiendo con Menezes (2009) y Muñoz y Vásquez (2012). Las bacterias endófitas son aquellas aisladas de tejidos de plantas desinfectados superficialmente o de su interior y que no causan algún efecto negativo inmediato o daño aparente en la planta hospedera (Hallmann *et al.*, 1997, mencionados por Mano y Morisaki, 2008). Evolutivamente, los endófitos son intermediarios entre saprófitos y patógenos (Pérez *et al.*, 2010). Se encuentran en los espacios intercelulares de los tejidos y con menor frecuencia intracelularmente y en tejidos vasculares (Pérez *et al.*, 2009).

Las muestras de raíces de maíz fueron desinfectadas superficialmente, para aislar bacterias endófitas, coincidiendo con Menezes (2009), quien trabajó con raíces y tallos de maíz, así como también, Garrido (2007) con raíces, tallos y hojas de *Panicum maximun* "pasto guinea", *Dichantium aristatum* "pasto Angleton", *Brachiaria* sp. y Mollo *et al.* (2012), con raíces y hojas de *Oryza sativa* L. La desinfección de los tejidos posibilita, no solo el aislamiento, sino también la cuantificación o determinación de la diversidad y densidad de bacterias endófitas cultivables (Pérez *et al.*, 2010; Marra *et al.*, 2012).

El macerado de raíces de maíz, previamente desinfectadas fue sembrado en medios semisólidos sin nitrógeno, para visualizar bacterias endófitas

diazotróficas. De igual manera, se utilizaron los medios LGI, JNFb y JMV para aislar bacterias rizosféricas y endófitas de raíces de maíz (Muñoz & Vásquez, 2012); así como también NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV para aislar bacterias rizosféricas y endófitas de raíces, tallo y hojas de pastos (Garrido, 2007).

Las bacterias diazotróficas microaerófilas fueron reconocidas por una película blanquecina, formada bajo la superficie del medio semisólido, donde la consistencia semisólida favorece el crecimiento y desplazamiento de las bacterias hacia el lugar, en el que la tasa de respiración está en equilibrio con la tasa de difusión del oxígeno y se mantienen las condiciones de microaerofilia, requeridas para la actividad de la nitrogenasa (Garrido, 2007; Franco, 2008). Al respecto, Sánchez (2008) aisló bacterias diazotróficas en los medios NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV, observando el desarrollo de la película aerotóxica blanca bajo la superficie, mientras que en los mismos medios sólidos las bacterias crecieron normalmente en la superficie, evidenciándose su condición de microaerófilos facultativos.

En los medios semisólidos, además de la película bacteriana se evidenció viraje del indicador. De igual manera, Mantilla (2007) observó viraje del indicador en NFb, debido a la alcalización por la actividad metabólica de la película bacteriana, con utilización del ácido málico y transformación en malato. A su vez, Sánchez (2008) observó viraje del indicador al azul, cuando el medio correspondiente era verde y a verde cuando era amarillo, lo que indicó un cambio de pH, por actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Para tener la certeza de obtener bacterias fijadoras de nitrógeno, se realizaron tres subcultivos en medios semisólidos sin nitrógeno, por cuanto estos medios son semiselectivos y contienen trazas de nitrógeno, proveniente de los reactivos y del agua destilada, que posibilitan el crecimiento de organismos que utilizan nitrógeno combinado. Los subcultivos sucesivos evitan el crecimiento de saprófitos y minimizan la ocurrencia de falsos positivos (Menezes, 2009). De esta manera, la frecuencia de muestras de raíces de maíz positivas para bacterias

fijadoras de nitrógeno fue disminuyendo desde 68,5% en NFb a la siembra, hasta 48,1% después del tercer subcultivo.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas pueden ser de vida libre, asociativas y endófitas. Las asociativas o endófitas facultativas colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de la raíz, siendo el género *Azospirillum* representante de este grupo. A su vez, las endófitas obligadas colonizan el interior de las raíces, mencionándose especies de *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* (Garrido, 2007). Estas bacterias dependen del hospedero para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión, a diferencia de las facultativas que cumplen una etapa de su ciclo fuera del hospedero, generalmente en el suelo (Beracochea, 2011).

En el presente estudio se utilizaron medios de cultivos semisólidos con diferentes fuente de carbono para la fijación de nitrógeno, a pH recomendados para bacterias específicas: NFb con ácido málico para *A. lipoferum*, *A. brasilens*, *A. irakense* y *A. halopreferens*; LGI con sacarosa para *Azospirillum amazonense*; JNFb con pH 5,8 para *Herbaspirillum*; LGI-P con 10% de sacarosa y pH 5,5 para *Gluconacetobacter* y JMV con manitol y pH 4,2 – 4,5 para *Burkholderia* spp. (Sánchez, 2008; Jha *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2012).

El medio LGI es similar al NFb, con la diferencia que la fuente de carbono sacarosa, el aumento en la concentración de la solución tampón y la reducción del pH son factores selectivos para aislar *A. amazonense*. Este criterio denota que la investigación de la fisiología de los microorganismos nuevos, se aplica en la metodología que permite la detección de forma más segura, barata y selectiva (Massena *et al.*, 2006). Por su parte, el aislamiento de *Herbaspirillum* puede ser confundido con *Azospirillum*, por lo que el pH inicial del medio JNFb se disminuyó a 5,8. Esta condición, aunada al desarrollo de colonias con la región central azul, en JNFb con una concentración de azul de bromotimol tres veces mayor, así como las colonias húmedas y pequeñas con el centro marrón en medio batata, identifican *Herbaspirillum* spp. (Punschke y Mayans, 2011).



El género *Azospirillum* fue aislado del 63,0% de raíces de maíz sembradas en NFb y LGI, superando a 43,48% reportado por Muñoz & Vásquez (2012) para raíces de maíz sembradas en NFb. En Lambayeque, estas bacterias fueron reportadas en el 55,7% de muestras de raíces de arroz (García & Muñoz, 2010) y 33% de raíces de tomate (Baiocchi & Saavedra, 2011). En otras investigaciones *Azospirillum* fue aislado de arroz (Xie & Yokota, 2005), maíz (Mehnaz *et al.*, 2007), cereales forrajeros (Moreira, 2010), sorgo (Díaz *et al.*, 2012) e incluso de suelo contaminado con petróleo (Young *et al.*, 2008).

*Azospirillum* fue identificado en el 87,5% de las bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de NFb, superando a 74,1% registrado por Muñoz & Vásquez (2012) para bacterias diazotróficas provenientes de raíces de maíz. Esta superioridad es explicada porque en el presente estudio las bacterias se aislaron de raíces desinfectadas por un proceso de aproximadamente 42 minutos, a diferencia a los 5 minutos de desinfección en hipoclorito de sodio, correspondiente a Muñoz & Vásquez (2012).

El género *Herbaspirillum* fue identificado en el 35,2% de muestras de raíces de maíz sembradas en JNFb y en el 31,6% de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Se coincide con Baldani *et al.* (1992), quienes reportaron esta bacteria en asociación con raíces de maíz. También se aisló de arroz (Baldani *et al.*, 2000) y *Pennisetum purpureum* (Kirchhof *et al.*, 2001), *Musa spp.* (Weber *et al.*, 2001) *Phaseolus vulgaris* (Valverde *et al.*, 2003), *Triticum sp.* (Rothballer *et al.*, 2006) y *Allium victorialis* (Jung *et al.*, 2007). Según Moreira *et al.* (2010) *Herbaspirillum* es menos frecuente que los demás diazotróficos conocidos, son endófitos obligatorios y su sobrevivencia es mínima sin el hospedero.

*Gluconacetobacter* fue identificado en el 35,2% de muestras de raíces de maíz sembradas en LGIP y en el 41,6% de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se coincide con Dibut *et al.* (2005) y Menhaz *et al.* (2006), quienes reportaron este género en asociación con maíz. También se aisló de *Ananas comosus* "piña" (Tapia *et al.*, 2000), *Coffea arabica* L. "café" (Fuentes *et al.*, 2001), *Musa*

*paradisiaca* "banana" (Muthukumarasamy *et al.*, 2002), arroz (Loganathan & Nair, 2003), *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar" (Massena *et al.*, 2006), *Citrullus lanatus* "melón", *Cucurbita máxima* "calabaza", *Manihot esculenta* "yuca", *Carica papaya* "papaya", y *Rosa canina* "rosa" (Menhaz *et al.*, 2006). Este es el primer reporte de *Herbaspirillum* y *Gluconacetobacter* en maíz en Lambayeque.

El género *Burkholderia* fue identificado en el 27,8% de muestras de raíces de maíz sembradas en JMV y en el 17% de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se coincide con Reis *et al.* (2004) quienes aislaron estas bacterias de maíz y caña de azúcar. También se aisló de arroz (Gillis *et al.*, 1995), banano (Weber *et al.*, 2000), café (Caballero *et al.*, 2004) forestales (Jang *et al.*, 2006), tomate (Caballero *et al.*, 2007), *Eleocharis dulcis* (Aizawa *et al.*, 2010) e incluso se encontró en endosimbiosis con el hongo micorrízico *Gigaspora margarita* (Minerdi *et al.*, 2001).

La mayor frecuencia de raíces de maíz con bacterias fijadoras de nitrógeno, se alcanzó en el medio NFb, seguido de LGI y LGI-P. Un valor inferior correspondió a JNFb y JMV. Se coincide con Marra *et al.*, (2012), quienes informaron que en la densidad de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas caracterizadas en *Syngonanthus elegans*, el mayor porcentaje correspondió a NFb, seguido de LGI y JNFb. A su vez, en *S. aciphyllum* fue NFb > JNFb > LGI > JMV. Por su parte, Menezes (2009) reportó que el mayor número de bacterias diazotróficas endófitas aisladas de raíces de maíz correspondió al medio LGI (40%), seguido de JMV (31%) y JNFb (29%).

La mayor frecuencia de raíces de maíz con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en NFb y LGI correspondió a *Azospirillum*. Estas bacterias establecen asociación con monocotiledóneas y dicotiledóneas (Baiocchi & Saavedra, 2011; Muñoz & Vásquez, 2012) y tienen una amplia distribución ecológica, debido a su baja especificidad en relación con la planta hospedadora y las diversas rutas metabólicas alternativas que le permiten utilizar ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos disponibles en la rizósfera (Carreño *et al.*, 2010). Se les puede encontrar en el mucílago de la rizósfera de las plantas, en

una colonización externa de las raíces, pero también pueden ingresar a los tejidos. Asimismo, en condiciones desfavorables producen melanina, polihidroxibutirato, polisacáridos, forman agregados celulares o "quistes" y presentan pleomorfismo (Cholula, 2005; Baca & Sánchez, 2010); mecanismos que explican su mayor número entre las bacterias diazotróficas endófitas aisladas. Por el contrario, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* son endófitos obligados, cuya sobrevivencia es mínimo, sin el hospedero (Garrido, 2007; Menezes, 2009; Moreira *et al.*, 2010).

*Azospirillum* predominó frente a *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*. Al respecto Marra *et al.* (2012) cuantificaron estas bacterias como rizosféricas y endófitas con el cultivo de flores *Syngonanthus sp* "siempre viva", determinando que en NFb y LGI sembrados con muestras de suelo rizosférico y tejido superficial de tallos se alcanzaron  $4,98$  y  $4,08 \text{ NMP} \times 10^4 \text{ g}^{-1}$  de tejido vegetal, en comparación con  $3,34 \text{ NMP} \times 10^4 \text{ g}^{-1}$  en JNFb. Las bacterias de *Azospirillum* son consideradas rizosféricas y *Herbaspirillum* son endófitas. En este contexto, en muestras de hojas y raíces desinfectadas y sembradas en JNFb se alcanzó  $2,49 \text{ NMP} \times 10^4 \text{ g}^{-1}$  de tejido foliar, en comparación con  $0,67$  y  $0,65$  en NFb y LGI, respectivamente.

En el 17 – 87,5% de las bacterias fijadoras de nitrógeno obtenidas en los diferentes medios semisólidos, se identificaron *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia*, lo que significa que el 83 – 12,5% de bacterias correspondieron a otros géneros. Según Baldani (2004), los medios NFb, JNFb y JMV son semiselectivos, para *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*, respectivamente; sin embargo, pueden crecer otros diazótrofos. De esta manera, Menezes (2009) utilizó LGI, JNFb y JMV para aislar bacterias diazotróficas de maíz, identificando *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Raoultella* como rizosféricas y *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Pantoea* y *Pseudomonas* como endófitas. Por su parte, Garrido (2007) además de *A. brasilense* y *A. lipoferum*, aisló *Klebsiella pneumoniae* de pastos guinea, angleton y braquiaria.

Corroborando lo expuesto, Sánchez (2008) investigó el crecimiento de ocho morfotipos de bacterias diazótrofes, determinando que cuatro (A10, A11, A24, A13) mostraron especificidad para su medio de aislamiento LGI-P y uno para JMV, mientras que A4 creció en LGI-P y JNFb; A12 en JMV y JNFb; A14 en JMV y NFb y A16 en JMV y LGI-P. Con base a los resultados, se concluyó que las bacterias eran diazótrofes, pero no era posible la determinación exacta del género, aun cuando solo haya crecido en uno de los medios semisólidos. En ese contexto, en el presente estudio también se realizó la caracterización fenotípica de las bacterias, confirmando los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia*.

La caracterización fenotípica incluyó la morfología, pruebas de hidrólisis de diversos sustratos, utilización de diferentes fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, entre otras. De igual manera, se identificó *Azospirillum* en malezas de maíz (Casos & Santiago, 2013), *Herbaspirillum* en arroz (Elbeltagy *et al.*, 2001; koomnok *et al.*, 2007), *Gluconacetobacter* en maíz, caña de azúcar, calabaza, melón, papaya y yuca (Dibut *et al.*, 2005) y *Burkholderia* en suelo rizosférico de maíz, pastos, caña de azúcar, café y frutales (Moreno y Galvis, 2013).

Las características fenotípicas ofrecen una visión detallada de la variación de las bacterias entre una o diferentes especies, permitiendo también reconocer los rasgos característicos de cada especie; no obstante, no evidencian la localización exacta de los microorganismos cuando se investigan la capacidad de colonización o distribución dentro del hospedero (Rives *et al.*, 2007). En este contexto, las técnicas convencionales de identificación no se pueden subestimar, sino que deben complementarse con las técnicas moleculares (Bou, 2011).

Todas las bacterias diazotróficas fijaron nitrógeno *in vitro*. Se coincide con Jou *et al.* (2005) y Mollo *et al.* (2012) quienes demostraron la fijación de nitrógeno *in vitro* mediante la técnica de reducción del acetileno, ARA, por *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia*.

Kennedy *et al.* (2004) demostraron que dependiendo de la variedad de arroz algunas especies de *Herbaspirillum* pueden fijar 19 – 54% del nitrógeno requerido para este cultivo. En cuanto a *Gluconacetobacter* se han descrito cuatro especies capaces de fijar nitrógeno (Moreira *et al.*, 2010). En algunas variedades de caña pueden contribuir con el 60% del nitrógeno requerido (Urquiada *et al.*, 1992). Respecto a *Burkholderia*, diversas especies son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis (Minerdi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006), vida libre y en asociación con plantas (Kim *et al.*, 2006; Perin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

El amonio producto de la fijación de nitrógeno *in vitro* se cuantificó por el método de Berttelot, basado en la aparición del azul de indofenol, producto de la reacción del ion amonio con los compuestos fenólicos, en presencia del agente hipoclorito de sodio y el catalizador ferrocianato de potasio (Lara *et al.*, 2007). Con las bacterias diazotróficas aisladas de maíz se cuantificó hasta 33,17ppm con *Azospirillum lipoferum* 1, superando las concentraciones de 32,13ppm (Casos & Santiago, 2013); 29,09ppm (García & Muñoz, 2010); 21,09ppm (Baiocchi & Savedra, 2011) y 20,48ppm (Muñoz & Vásquez, 2012) reportados para *Azospirillum* spp. aisladas de malezas asociadas a maíz, arroz, tomate y maíz, respectivamente.

Con las bacterias endófitas que alcanzaron las mayores concentraciones de amonio en cada uno de los géneros identificados, se confirmó la diazotrofia con la presencia del gen *nifH* en el ADN bacteriano. Se coincide con Jha *et al.* (2009), quienes verificaron el potencial de fijación de nitrógeno en siete aislados de proteobacterias representativas de los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , aisladas de arroz, obteniendo un producto de 360 pares de bases, correspondiente a un fragmento del gen *nifH* en *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*. El gen *nifH* codifica la ferroproteína dinitrogenasa reductasa y es uno de los genes estructurales (*nifHDK*) de la nitrogenasa (Jou *et al.*, 2005) o complejo que cataliza la conversión del nitrógeno gaseoso a amoníaco en la fijación biológica de nitrógeno (Mayz, 2004).

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ Las bacterias endófitas aisladas de raíces de maíz son, microaerófilas, fijan nitrógeno *in vitro* y presentan el gen *nifH*.
- ✓ Se aislaron bacterias endófitas diazotróficas en raíces de cultivos de maíz en Lambayeque.
- ✓ La caracterización fenotípica de 132 bacterias endófitas diazotróficas identificó *Azospirillum* (45,5%), *Herbaspirillum* (6,1%), *Gluconacetobacter* (7,6%) y *Burkholderia* (2,3%) en raíces de maíz.
- ✓ Las bacterias endófitas aisladas de maíz fijaron nitrógeno *in vitro* alcanzando 5,75–33,17ppm de amonio (*Azospirillum* spp.), 9,61–21,38ppm (*Herbaspirillum* spp.), 6,0–30,57ppm (*Gluconacetobacter* spp.) y 9,96 – 28,78ppm (*Burkholderia* spp.).
- ✓ Se identificó el gen *nifH* en *Azospirillum lipoferum* 1, *Herbaspirillum* EDH1, *Gluconacetobacter* EDG1 y *Burkholderia* EDB1.

## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de las bacterias endófitas diazotróficas en el desarrollo vegetativo de maíz en condiciones de invernadero.
- ✓ Investigar la producción de ácido indol acético y solubilización de fosfato por las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de maíz.
- ✓ Determinar el efecto de *Azospirillum lipoferum* 1, *Herbaspirillum* EDH1, *Gluconacetobacter* EDG1 y *Burkholderia* EDB1, en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz, en condiciones de campo.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de determinar las características de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L. "maíz", como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, que contaminan el ambiente. Las raíces se lavaron con detergente neutro, se desinfectaron con alcohol e hipoclorito de sodio y se enjuagaron con solución tampón y agua destilada esterilizada. Después, se obtuvo el macerado que se sembró en los medios semisólidos sin nitrógeno NFb Y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum*, LGI-P para *Gluconacetobacter* y JMV para *Burkholderia* spp. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y por el viraje del indicador, siendo aisladas en sus respectivos medios sólidos. Se obtuvieron 132 cultivos bacterianos entre los que se indentificó *Azospirillum* (45,5%), *Herbaspirillum* (6,1%), *Gluconacetobacter* (7,6%) y *Burkholderia* (2,3%). Estas bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 5,75–33,17ppm de amonio (*Azospirillum* spp.), 9,61–21,38ppm (*Herbaspirillum* spp.), 6,0–30,57ppm (*Gluconacetobacter* spp.) y 9,96–28,78ppm (*Burkholderia* spp.). Se identificó el gen *nifH* en *Azospirillum lipoferum* 1, *Herbaspirillum* EDH1, *Gluconacetobacter* EDG1 y *Burkholderia* EDB1, demostrándose el potencial de las bacterias endófitas aisladas de maíz como fijadoras de nitrógeno.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R. (2009). El cultivo de maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 30(2), 113-120.
- Aguado, S. (Ed.). (2012). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. México. Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)
- Aizawa, T., Nakajima, N. & Sunairi, M. (2010). *Burkholderia heleia* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1152-1157.
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2000). Agroecología: Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Serie Textos Básicos para la Formación Ambiental. PNUMA.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Baca, L. & Sánchez, M. (2010). *Concentración de polihidroxialcanoatos de cepas nativas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y *Oryza sativa* L. "arroz". Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baiocchi, A. & Saavedra, P. (2011). *Caracterización de cepas nativas Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baldani, V., Baldani, J. & Dobereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility Soils*, 30, 485-491.

- Baldani, V., Baldani, J., Olivares, F. & Dobereiner, J. (1992). Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13, 65-73.
- Baldani, J. (2004). Isolation and characterization of diazotrophic from banana and pine apple plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 549–579.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Blanco, H. (2007). *Comparativo de rendimiento de 8 híbridos de maíz amarillo duro (Zea mays L.) bajo condiciones agroclimáticas de la parte media del valle Chancay, Lambayeque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Bou, G. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601.
- Brenner, D., Krieg N., & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. the Proteobacteria, Part B, the Gamnoproteobacteria*. 2(2) USA: Springer.
- Caballero, I., Martinez, L. & Paredes, G., Estrada, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub> – fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1165-1172.
- Caballero, J., Onofre, J., Estrada, P. & Martinez, L. (2007). The tomato rhizosphere and environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5308-5319.

- Cadena, S., & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreño, C., Escobar, C., García, F., Horna, Y., Mendoza, G. & Muñoz, H. (2010). *Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carrera, A. (2012). *Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de Azospirillum spp. del cultivo de maíz (Zea mays L.) de la sierra ecuatoriana*. Tesis de Licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador.
- Cholula, L.P. (2005). *Estudio de la producción de poli B - hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp. 7*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Casos, I. & Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Chen, W., James, E., Coenye, T., Chov, J., J.H, Barrios, E., De Faria, S., Elliott, G., Shev, S., Sprent, J. & Vandamme, P. (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. From Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1847-1851.
- Delgado, Y. (2011). *Control de malezas en cultivo de maíz (Zea mays L.) utilizando tres herbicidas pre – emergentes, en la granja "pradera" Chaltura–Imbabura*. Tesis de Maestría. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.

- Díaz, B., Cupull, R., Alvarado, J., Torres, R., Suárez, A. & Hernández, P. (2012). Caracterización de bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de sorgo con potencialidades en la estimulación del crecimiento vegetal. *Centro Agrícola*, 39(4), 45-48.
- Dibut, B., Ortega, M., Martínez, R., Fery, L. & Ríos, Y. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 26(2), 5-10.
- Eckert, B., Weber, O., Kinchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 17-26.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Sato, T., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2000). Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293.
- Elmerich, C. (2012). Investigating biological nitrogen fixation, towards poverty alleviation through sustainable agriculture. *Netherlands, Springer*, 145-147.
- Eskin, N. (2012). *Colonization of Zea mays by the nitrogen fixing bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus*. Degree of Master. Western University London, Ontario, Canada.
- Federación Nacional de Cultivares de Cereales, FENALCE (2010). El Cerealista, 10–19. Recuperado de [www.Finagro.com.co](http://www.Finagro.com.co).
- Feijóo, C. (2005). *Comparativo de los cultivares de maíz chala (Zea mays L.) a tres distanciamientos en el valle de Tumbes*. Tesis de Ingeniería. Universidad Nacional de Tumbes, Perú.

- Fuentes, L., Bustillos, R., Tapia, A., Jimenez, T., Wang, E., Martinez, E. & Caballero, J. (2000). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Washington, 51, 1305-1314.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España.
- Frioni, L. (2006). *Microbiología Básica, Ambiental y Agrícola*. Uruguay: Publicaciones Universidad de la República Oriental del Uruguay.
- García, F., & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.
- Gillis, M., Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. & Fernández, M. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 274-289.

- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 182-190.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. Colombia: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Injante, P. & Joyo, G. (2010). Manejo integrado de maíz amarillo duro. Curso-Taller. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45, 62-72.
- Ji S., Gurunani, A., & Chun, S. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>
- Jung, S., Lee, M., Oh, T. & Yoon, J. (2007). *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2284-2288.
- Kennedy, I., Choudhury, A. & Kecskés, M. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1229-1244.

- Kim, H., Park, M., Yang, H., An, D., Jin, H. & Yang, D. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., abeta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2529-2533.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J., Reis, V. & Hartman, A. (2001). *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 157-168.
- Koomnok, CH., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *Science Asia*, 33, 429-435.
- Lara, C., Villalba, M., & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14.
- Llatas, S. (2006). Estudio de las Poaceas Peruanas. Lambayeque, Perú.
- Loaces, I. (2011). *Caracterización de bacterias endófitas productoras de sideróforos en arroz (Oryza sativa)*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias Universidad de la República.
- Loganathan, P. & Nair, S. (2003). Crop Specific endophytic colonization by a novel, salttolerant, nittrongen fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* spp. From wild rice. *Biotechnology Letters*, 25, 497 - 501.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en período de enraizamiento*. Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Mano, H. & Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environmental*, 23(2), 109-117.

- Marra, L., Graziotti, P., Nunes, U. & de Souza, F. (2012). Bacterias Diazotróficas Em Sempre-Viva. *Bioscience. J., Uberlandia*, 28 (1), 17 - 24.
- Massena, V. Baldani, V. & Baldani, J. (2006). Ecología, Isolamento e identificacao de bactérias diazotróficas. Recuperado de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2006000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Mayz, I. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Mbai, F., Magiri, E., Matiru, V., Ng'ang'a, V., & Nyambati V. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Comtemporary Research*, 3(4), 25-40
- McInroy, J., & Kloepper, J. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil Microbiology- Springer Science*, 173, 337-342.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2006). Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(6), 496-501.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum zeae* sp. Nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2805-2809.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazótrofes asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. Tesis de Licenciatura. Universidad de La República, Montevideo, Uruguay.
- Ministerio de Agricultura, MINAG. (2013). *Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA*, Perú: Dirección de Información Agraria. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/>



- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI. (2012). *Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA*, Perú: Dirección de Información Agraria. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/portal/>
- Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R., Boarino, A. & Bonfante, P. (2001). Nitrogen fixation genes in a endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 725-732
- Moreno, L. & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37.
- Moreira, F., da Silva, K., Abrahao, R. & Carvalho, F. (2010). Bacterias diazotróficas asociativas: diversidad, ecología e potencial de aplicaciones. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-99.
- Mollo, G., Ferrando, L., & Fernández, S. (2012). Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. Acta 7mo Congreso De Medio Ambiente AUGM. La Plata Argentina. Recuperado de [http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/download/909/208\\_](http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/download/909/208_)
- Municipalidad Distrital de Reque (2013). Recuperado de [http://www.peru.gob.pe/Nuevo\\_Portal\\_Municipalidad/portales/Municipalidad/es/1244/entidad/pm\\_municipalidad.asp](http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipalidad/portales/Municipalidad/es/1244/entidad/pm_municipalidad.asp)
- Muñoz, V., & Vásquez, R. (2012). *Caracterización de Azospirillum spp. nativas y su efecto en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S. & Lakshminarasimhan, C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*) a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, 83, 137-145.
- Pedraza, R., Bellone, C., & de Bellone, C. (2010). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45,36-43.
- Peña, H., & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Venezolana Interciencia*, 32(8), 23-32.
- Pérez, A., Rojas, J., & Vale, H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana Ciencia Animada*, 1(2), 14-23.
- Pérez, A., Rojas, J., & Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Perín, L., Martínez, L., Paredes, G., Baldani, J., Estrada, P., Reis, V.; & Caballero, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1931-1937.
- Punschke, K., & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.
- Rangel, L., Rodriguez, M., & Cerrato, J. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en Maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.

- Reis, V., Estrada, P., Tenorio, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S. (...) & Caballero, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155-2162.
- Rives, N., Acebo, Y. & Hernández, A. (2007). Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.
- Rothballer, M., Schmid, M., Klein, I., Gatteringer, A., Grundmann, S., & Hartmann, A. (2006). *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1341-1348.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. Degree of Master. The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, S. (2008). *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado*. Tesis de Maestría. Universidad Agraria la Habana, Cuba.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SARGARPA 2010. Uso de fertilizantes. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/>
- Serquén, J. (2004). *Efecto de la densidad de siembra y dosis de fertilización balannuada en el rendimiento de maíz amarillo duro en las localidades del valle Chancay Lambayeque, 2003*. Tesis de Ingeniería. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Schoebitz, M., (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico modelo género Azospirillum spp.* Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile.
- Tapia, A., Bustellos, M., Jiménez, T., Caballero, J., & Fuentes, L. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pine apple plants. *Microbial Ecology*, 39, 49-55.
- Tovar, O. (2008). Estudio Florístico de los Pastizales de la Costa Norte del Perú. *Revista Peruana Biológica*, 12(3), 397-413.
- United States Department of Agriculture, USDA. (2013). *Journal Department of Agriculture of the United States*, 32(9), 506-524.
- Urquiada, S., Cruz, K. & Badhey, R. (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of American Journal*, 56, 105-114.
- Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., & Igual, J. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1979-1983.
- Vicentini, K. (2006). *Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivos de arroz irrigado.* Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
- Weber, O., Baldani, I., & Dobereiner, I. (2000). Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 2277-2285.
- Xie, C., & Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1435-1438.

- Yang, H., Im, W., Kim, K., An, D., & Lee, S. (2006). *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 453-457.
- You, M., Nishiguchi, T., Saito, A., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2005). Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: Daily rhythm during the light-dark cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8183-8190.
- Young, C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M., Arun, A., Lai, W., Rekha, P., Shen, F., Hung, M., Chen, W. & Yassin, A. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 959-963.
- Zamudio, J., & Vasquez. (2013). Programa de complementación de ingresos y reducción de la dependencia alimentaria: Producción de maíz amarillo duro en la costa norte del Perú. Recuperado de <http://www.apear.gob.pe>.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas (en Alvitres, 2000)**

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,8)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z= 1,96 ( $\alpha$ = 0,05) valor estándar

p = prevalencia o presencia de bacterias endófitas diazotróficas en raíces (0,90)

q = 1-p, ausencia (0,10)

T= error estimado (0,08)

## ANEXO 2

### Medios de cultivo para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias endófitas diazotróficas (en Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009)

#### a. Solución tampón fosfato de potasio, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0

| Componentes                     | gL <sup>-1</sup> |
|---------------------------------|------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 9,304            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 8,709            |
| Agua destilada                  | 1000mL           |

Verificar el pH 7,0 y autoclavar.

#### b. Agar nutritivo (AN)

| Componentes                           | gL <sup>-1</sup> |
|---------------------------------------|------------------|
| Peptona                               | 5,0              |
| Extracto de carne                     | 3,0              |
| Agar agar                             | 15,0             |
| Agua destilada en cantidad suficiente | 1000mL           |

#### c. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum irakense* y *Azospirillum halopraeferens*)

| Componentes                           | gL <sup>-1</sup> |
|---------------------------------------|------------------|
| Ácido málico                          | 5,0              |
| K <sub>2</sub> .HPO <sub>4</sub>      | 0,5              |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O   | 0,2              |
| NaCl                                  | 0,1              |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O   | 0.02g            |
| Solución de micronutrientes I         | 2mL              |
| Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N) | 2mL              |
| FeEDTA (Solución 1,64%)               | 4mL              |
| Solución de vitaminas I (Biotinol)    | 1mL              |
| KOH                                   | 4,5g             |



Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 - 6.8. Para el medio semisólido agregar 1,75 - 1.8g de agar agarL<sup>-1</sup> y para el medio sólido 15g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Solución de micronutrientes I:

| Componentes   | gL <sup>-1</sup> |
|---|------------------|
| CuSO <sub>4</sub>                                   | 0,04             |
| ZnSO <sub>4</sub>                                   | 1,20             |
| H3BO4   | 1,40             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 1,00             |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 1,175            |

Completar el volumen a 1000mL con agua destilada.

FeEDTA (Solución 1.64%)

Preparar una solución madre con 7,0g de Fe SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y 2g de EDTA de potásico en 1L de agua destilada. Luego, tomar 1,17mL de la solución madre y completar a 1L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

**d. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)**

El medio de cultivo LGI, fue desarrollado a partir del medio LG (Lipman, 1904). La I hace referencia al investigador J. Ivo Baldani. Este medio promueve el aislamiento de *Azospirillum amazonense*.

| Componentes   | g l <sup>-1</sup> |
|---|-------------------|
| Cristal de azúcar                                   | 5,0               |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 0,2               |
| MgSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,2               |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,02              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,002             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,6               |
| Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)               | 5mL               |
| FeEDTA (Solución 1,64%)                             | 4mL               |
| Solución de vitaminas I (Biotinol)                  | 1mL               |
| Agua destilada en cantidad suficiente               | 1000mL            |

Ajustar el pH a 6,0–6,2. Para medio semisólido adicionar 1,75g de agar agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 15g de agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**e. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp.)**

El medio JNFb fue desarrollado por la investigadora Johanna Döbereiner a partir del medio NFb. La J hace referencia a la investigadora.

| Componentes                            | g L <sup>-1</sup> |
|--|-------------------|
| Acido málico                           | 5.0               |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 0,6               |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 0,2               |
| NaCl                                   | 0.1               |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 0,02              |
| Solución de micronutrientes I          | 2mL               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1,8               |
| Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N) | 2mL               |
| FeEDTA (Solución 1,64 %)               | 4mL               |
| Solución de vitaminas I (Biotinol)     | 1mL               |
| KOH                                    | 4,5               |
| Agua destilada en cantidad suficiente  | 1000mL            |

Ajustar el pH a 5,8. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 18g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**f. Medio de cultivo LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)**

Este medio fue desarrollado a partir del medio de cultivo LGI (Baldani, 1984), en donde la P hace referencia a Pernambuco, lugar de aislamiento de la primera cepa de *Acetobacter diazotrophicus*.

| Componentes   | gL <sup>-1</sup> |
|---|------------------|
| Cristal de azúcar                                   | 100              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 0,2              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0,2              |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,02             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,6              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,002            |
| Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)              | 5mL              |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,01             |
| Solución de vitaminas I (Biotinol)                  | 1mL              |
| Agua destilada en cantidad suficiente               | 1000mL           |

Ajustar el pH a 5.5. Para medios semisólidos agregar 1,8g de agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 17g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**g. Medio de cultivo JMV (*Burkholderia* spp.)**

| Componentes                            | gL <sup>-1</sup> |
|--|------------------|
| Manitol                                | 5,0              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 0,6              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1,8              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | 0,2              |
| NaCl                                   | 0,1              |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O   | 0,2              |
| Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N) | 2mL              |
| Agar agar                              | 2,1              |
| Solución de micronutrientes II         | 2mL              |
| Solución de vitaminas II               | 2mL              |
| Agua destilada en cantidad suficiente  | 1000mL           |

Ajustar el pH a 5,0.

Para obtener la solución de vitaminas II, diluir una pastilla de complejo B comercial en 10mL de agua destilada.

Solución de micronutrientes II:

| Componentes   | gL <sup>-1</sup> |
|---|------------------|
| ZnSO <sub>4</sub>                                   | 0,1              |
| MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,03             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>                      | 0,3              |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,2              |
| CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,01             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,03             |

**h. Caldo extracto de suelo al 10% (en García & Muñoz, 2010)**

| Componentes                          | gL <sup>-1</sup> |
|--------------------------------------|------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,4              |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 0,1              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,05             |
| FeCl <sub>3</sub>                    | 0,01             |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0,1              |
| Triptona                             | 1,0              |
| Extracto de levadura                 | 1,0              |
| Extracto de suelo al 10%             | 250mL            |
| Agua destilada                       | 750mL            |

Ajustar a pH 7,3 para obtener extracto de suelo al 10%, depositar en un matraz 250g de suelo agrícola y 500mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25mL del filtrado y completar a 500mL con agua destilada.

**i. Reactivos (en Lara *et al.*, 2007; Cadena & Martinez, 2011)**

**• Cloruro de potasio 2M**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Cloruro de potasio | 149,12g |
| Agua destilada     | 1000mL  |

**• Solución alcohólica de fenol 10%**

|                   |      |
|-------------------|------|
| Fenol concentrado | 10mL |
| Alcohol 97°       | 90mL |

**• Nitroprusiato de sodio 0,5%**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Nitroprusiato de sodio | 0,5g  |
| Agua destilada         | 100mL |

**• Solución oxidante**

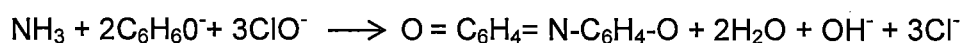
|   |       |
|---|-------|
| Citrato de sodio                          | 20g   |
| Hidróxido de sodio                        | 1g    |
| Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial) | 2mL   |
| Agua destilada                            | 100mL |

### ANEXO 3

#### Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio (en Lara *et al.*, 2007)

##### a. Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio ( $\text{NH}_4$ ) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante, el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



##### b. Preparación de diluciones a partir de una solución madre de $\text{NH}_4\text{Cl}$

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , para lo cual se pesa 0,1g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se disuelve en 1L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

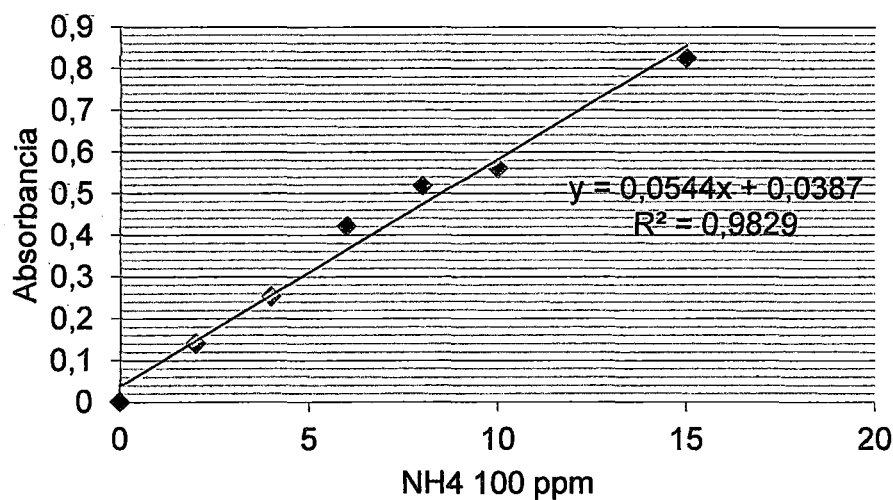
| N° de tubo | Solución patrón<br>[mL] | H <sub>2</sub> O bidestilada<br>[mL] | NH <sub>4</sub> Cl<br>(Ug/mL = ppm)<br>NH <sub>4</sub> Cl |
|------------|-------------------------|--------------------------------------|---|
| 1          | 0,0                     | 10,0                                 | 0   |
| 2          | 0,2                     | 9,8                                  | 2   |
| 3          | 0,4                     | 9,6                                  | 4   |
| 4          | 0,6                     | 9,4                                  | 6   |
| 5          | 0,8                     | 9,2                                  | 8   |
| 6          | 1,0                     | 9,0                                  | 10  |
| 7          | 1,5                     | 8,5                                  | 15  |
| 8          | 2,0                     | 8,0                                  | 20  |

**c. Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría**

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso según la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9nm. Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

| Nº tubo | NH <sub>4</sub> 100 (ppm) | Absorbancia | Absorbancia corregida |
|---------|---------------------------|-------------|-----------------------|
| 01      | 0                         | 0,058       | 0,000                 |
| 02      | 2                         | 0,199       | 0,141                 |
| 03      | 4                         | 0,311       | 0,253                 |
| 04      | 6                         | 0,480       | 0,422                 |
| 05      | 8                         | 0,576       | 0,518                 |
| 06      | 10                        | 0,619       | 0,561                 |
| 07      | 15                        | 0,884       | 0,826                 |

Obtenida la absorbancia de las siete concentraciones de amonio, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0.0544x + 0.0387$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de amonio (ppm) fijado por cada bacteria nativa.

$$x = (y - 0.0387) / (0.0544)$$



# ANEXO 4

## Bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

| Medios  | NFb            |   |                |                |                | LGI            |                |                |                | JNFb           |                |                |                | LGI-P          |                |                |                | JMV            |                |                |                |
|---------|----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| S       | S <sub>0</sub> |   | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>0</sub> | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>0</sub> | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>0</sub> | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>0</sub> | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> |
| M**     | a              | b |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
| M1      | +              | + | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              |
| M2      | -              | + | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M3      | +              | - | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M4      | +              | + | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              |
| M5      | -              | - | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M6      | +              | + | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M7      | -              | + | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M8      | +              | + | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M9      | +              | + | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M10     | +              | - | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | +              | +              | -              | -              |
| M11     | +              | + | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              |
| M12     | -              | - | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M13     | +              | + | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M14     | +              | - | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M15     | +              | + | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M16     | -              | + | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M17     | +              | - | +              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M18     | +              | + | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M19     | -              | + | +              | -              | -              | +              | -              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M20     | +              | - | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M21     | +              | + | -              | +              | -              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M22     | -              | + | -              | -              | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | +              | -              | -              |
| M23     | +              | + | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M24     | +              | + | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M25     | +              | + | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M26     | +              | - | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M27     | +              | - | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M28     | +              | + | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M29     | -              | + | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M30     | -              | - | -              | -              | -              |                |                |                |                | -              | -              | -              | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M31     | +              | + | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              |
| M32     | -              | + | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M33     | +              | + | -              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M34     | +              | - | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M35     | +              | + | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M36     | -              | + | -              | -              | -              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M37     | +              | - | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M38     | +              | + | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M39     | -              | - | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M40     | +              | + | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M41     | -              | + | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              |
| M42     | +              | + | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M43     | -              | - | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M44     | +              | + | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              |
| M45     | +              | + | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              |
| M46     | -              | - | +              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M47     | +              | + | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M48     | +              | + | +              | +              | +              | -              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              |
| M49     | -              | + | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M50     | +              | - | +              | +              | +              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | +              |
| M51     | -              | + | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M52     | +              | - | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | +              | +              | +              | +              | -              | -              | -              | -              |
| M53     | +              | + | -              | -              | -              | +              | -              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              |
| M54     | +              | + | -              | -              | -              | +              | -              | -              | -              | -              | +              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | +              | +              | -              | -              |
| Total + | 37             |   | 30             | 29             | 26             | 28             | 23             | 20             | 18             | 19             | 16             | 15             | 10             | 19             | 16             | 15             | 13             | 15             | 12             | 10             | 10             |

M=Muestra; S<sub>0</sub>=Siembra (a=10<sup>-1</sup>, b=10<sup>-2</sup>); S<sub>1-2-3</sub>=Subcultivos.

**Azospirillum spp. aisladas en muestras de raíces de Zea mays L. en medios  
NFb y LGI**

| <b>Azospirillum spp.</b>   | <b>Muestra<br/>N°</b> | <b>Medio</b> | <b>Azospirillum spp.</b>   | <b>Muestra<br/>N°</b> | <b>Medio</b> |
|----------------------------|-----------------------|--------------|----------------------------|-----------------------|--------------|
| <i>A. lipoferum</i> 1      | 1                     | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 14     | 48                    | NFb          |
| <i>Azospirillum</i> sp. 1  | 4                     | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 15     | 31                    | LGI          |
| <i>Azospirillum</i> sp. 2  | 5                     | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 16     | 49                    | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 2      | 6                     | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 17     | 50                    | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 3      | 1                     | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 18     | 33                    | LGI          |
| <i>Azospirillum</i> sp. 3  | 3                     | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 19     | 52                    | NFb          |
| <i>Azospirillum</i> sp. 4  | 11                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 20     | 42                    | NFb          |
| <i>A. halopraeferens</i> 1 | 14                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 21     | 24                    | NFb          |
| <i>Azospirillum</i> sp. 5  | 17                    | NFb          | <i>A. halopraeferens</i> 6 | 35                    | LGI          |
| <i>A. brasilense</i> 1     | 18                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 22     | 37                    | LGI          |
| <i>A. brasilense</i> 2     | 20                    | NFb          | <i>A. brasilense</i> 8     | 14                    | NFb          |
| <i>A. brasilense</i> 3     | 5                     | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 23     | 37                    | LGI          |
| <i>A. brasilense</i> 4     | 11                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 24     | 44                    | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 4      | 24                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 25     | 43                    | LGI          |
| <i>A. halopraeferens</i> 2 | 25                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 26     | 45                    | LGI          |
| <i>A. halopraeferens</i> 3 | 26                    | NFb          | <i>A. brasilense</i> 9     | 48                    | LGI          |
| <i>A. halopraeferens</i> 4 | 28                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 27     | 8                     | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 5      | 31                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 28     | 50                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 6      | 14                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 29     | 34                    | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 7      | 34                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 30     | 35                    | LGI          |
| <i>A. halopraeferens</i> 5 | 37                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 31     | 50                    | NFb          |
| <i>A. brasilense</i> 5     | 38                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 32     | 29                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 8      | 16                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 33     | 14                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 9      | 21                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 34     | 24                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 10     | 40                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 35     | 21                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 11     | 24                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 36     | 52                    | NFb          |
| <i>A. lipoferum</i> 12     | 42                    | NFb          | <i>A. halopraeferens</i> 7 | 31                    | NFb          |
| <i>A. brasilense</i> 6     | 44                    | NFb          | <i>A. lipoferum</i> 37     | 48                    | LGI          |
| <i>A. lipoferum</i> 13     | 29                    | LGI          | <i>A. lipoferum</i> 38     | 14                    | LGI          |
| <i>A. brasilense</i> 7     | 45                    | NFb          | <i>Azospirillum</i> sp. 6  | 34                    | LGI          |

\* De un total de 71 cultivos puros aislados en los medios NFb y LGI, 60 pertenecieron al género *Azospirillum* spp. y 11 a otros géneros bacterianos.

***Herbaspirillum* spp. aisladas en muestras de raíces de *Zea mays* L. en medio JNFb**

| <i>Herbaspirillum</i> spp. | Muestra N° | Medio |
|----------------------------|------------|-------|
| EDH1                       | 3          | JNFb  |
| EDH2                       | 8          | JNFb  |
| EDH3                       | 23         | JNFb  |
| EDH4                       | 28         | JNFb  |
| EDH5                       | 35         | JNFb  |
| EDH6                       | 38         | JNFb  |
| EDH7                       | 47         | JNFb  |
| EDH8                       | 49         | JNFb  |

\* De un total de 19 cultivos puros aislados en el medio JNFb, ocho pertenecieron al género *Herbaspirillum* spp. y 11 a otros géneros bacterianos.

***Gluconacetobacter* spp. aisladas en muestras de raíces de *Zea mays* L. en medio LGI-P**

| <i>Gluconacetobacter</i> spp. | Muestra N° | Medio |
|-------------------------------|------------|-------|
| EDG1                          | 3          | LGI-P |
| EDG2                          | 8          | LGI-P |
| EDG3                          | 14         | LGI-P |
| EDG4                          | 17         | LGI-P |
| EDG5                          | 21         | LGI-P |
| EDG6                          | 24         | LGI-P |
| EDG7                          | 31         | LGI-P |
| EDG8                          | 37         | LGI-P |
| EDG9                          | 43         | LGI-P |
| EDG10                         | 51         | LGI-P |

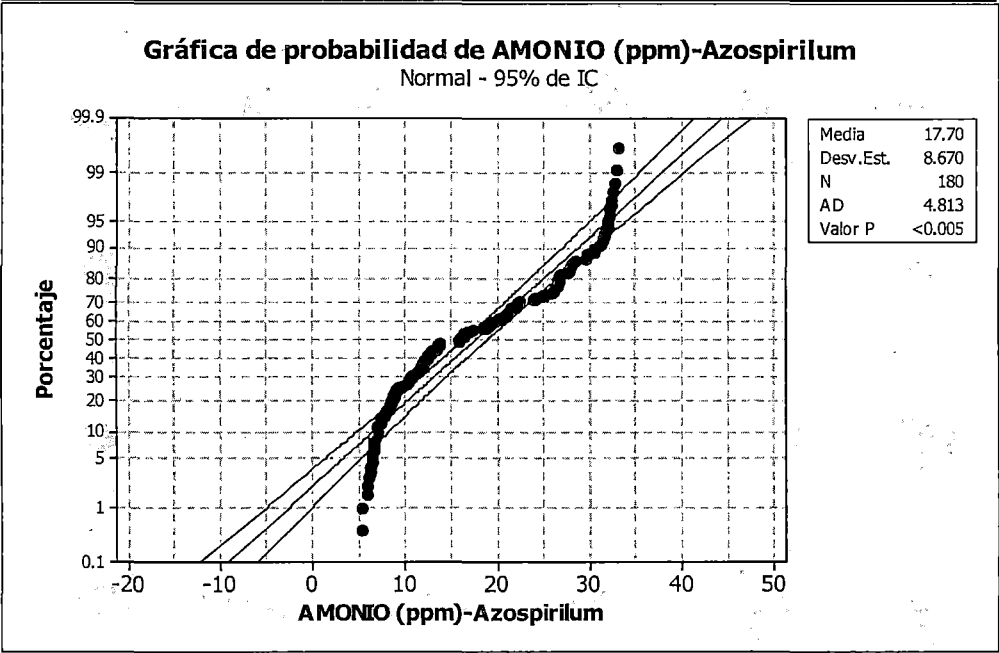
\* De un total de 24 cultivos puros aislados en el medio LGI-P, diez pertenecieron al género *Gluconacetobacter* spp. y 14 a otros géneros bacterianos.

***Burkholderia* spp. aisladas en muestras de raíces de *Zea mays* L. en medio  
JMV**

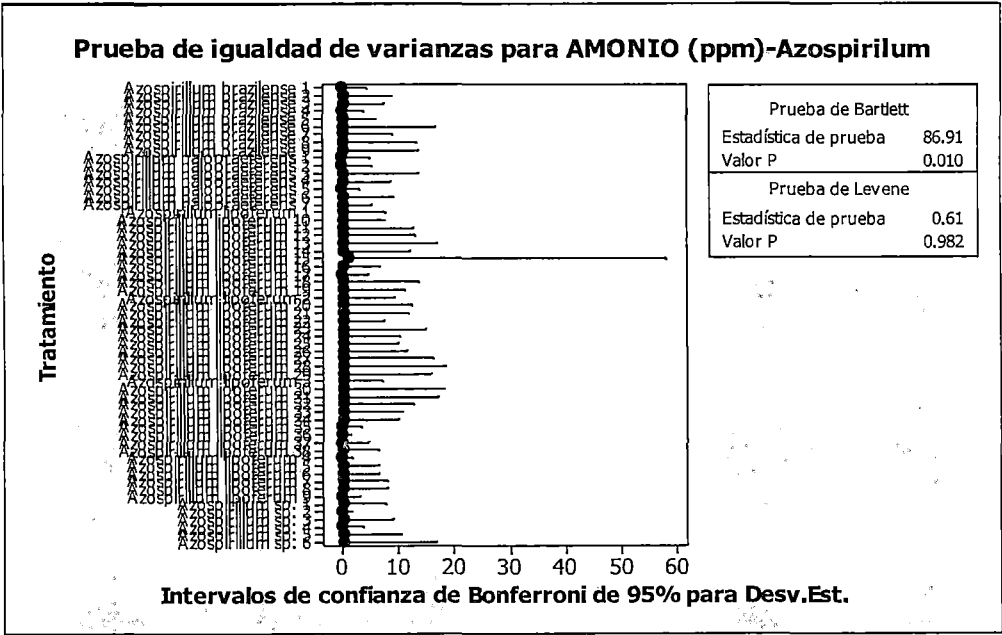
| <b><i>Burkholderia</i> spp.</b> | <b>Muestra<br/>N°</b> | <b>Medio</b> |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|
| EDB1                            | 4                     | JMV          |
| EDB2                            | 15                    | JMV          |
| EDB3                            | 19                    | JMV          |
| EDB4                            | 28                    | JMV          |
| EDB5                            | 48                    | JMV          |

\* De un total de 18 cultivos puros aislados en el medio JMV, cinco pertenecieron al género *Burkholderia* spp. y 13 a otros géneros bacterianos.

ANEXO 5



Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



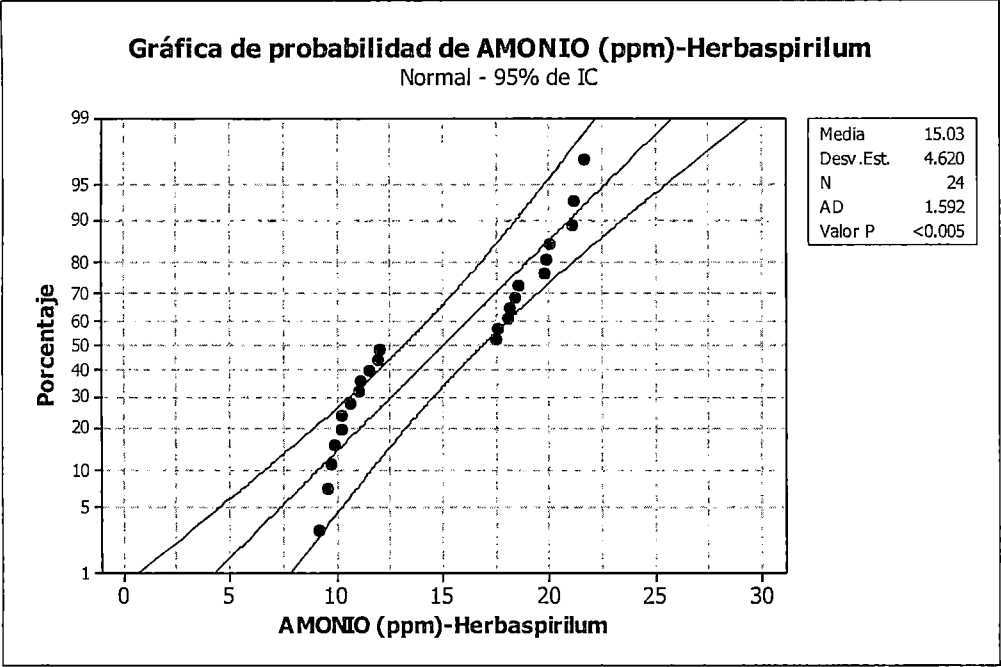
Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

| Variable     | Tratamiento                | N | Medias | D.E. | Medianas | H      | p       |
|--------------|----------------------------|---|--------|------|----------|--------|---------|
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 1     | 3 | 28,05  | 0,09 | 28,02    | 178,74 | <0,0001 |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 2     | 3 | 27,97  | 0,19 | 27,95    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 3     | 3 | 26,94  | 0,15 | 26,92    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 4     | 3 | 26,87  | 0,08 | 26,90    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 5     | 3 | 21,38  | 0,13 | 21,33    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 6     | 3 | 17,08  | 0,34 | 6,94     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 7     | 3 | 16,37  | 0,18 | 16,31    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 8     | 3 | 11,59  | 0,27 | 11,70    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. brasilense</i> 9     | 3 | 9,26   | 0,28 | 9,42     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 1 | 3 | 29,88  | 0,10 | 29,86    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 2 | 3 | 26,40  | 0,10 | 26,37    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 3 | 3 | 26,17  | 0,28 | 26,11    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 4 | 3 | 25,20  | 0,17 | 25,21    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 5 | 3 | 21,65  | 0,06 | 21,64    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 6 | 3 | 12,21  | 0,19 | 12,27    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. halopraeferens</i> 7 | 3 | 6,75   | 0,11 | 6,81     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 1      | 3 | 33,17  | 0,16 | 33,20    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 10     | 3 | 19,74  | 0,16 | 19,67    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 11     | 3 | 19,44  | 0,26 | 19,49    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 12     | 3 | 18,90  | 0,27 | 19,03    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 13     | 3 | 16,76  | 0,35 | 16,60    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 14     | 3 | 16,17  | 0,25 | 16,03    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 15     | 3 | 14,59  | 1,19 | 14,01    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 16     | 3 | 13,86  | 0,14 | 13,94    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 17     | 3 | 13,60  | 0,09 | 13,61    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 18     | 3 | 12,97  | 0,28 | 12,95    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 19     | 3 | 12,77  | 0,23 | 12,71    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 2      | 3 | 32,04  | 0,19 | 32,12    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 20     | 3 | 12,60  | 0,25 | 12,65    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 21     | 3 | 12,38  | 0,24 | 12,40    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 22     | 3 | 12,07  | 0,15 | 12,14    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 23     | 3 | 11,27  | 0,30 | 11,42    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 24     | 3 | 10,74  | 0,21 | 10,85    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 25     | 3 | 10,55  | 0,20 | 10,63    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 26     | 3 | 10,35  | 0,24 | 10,45    |        |         |

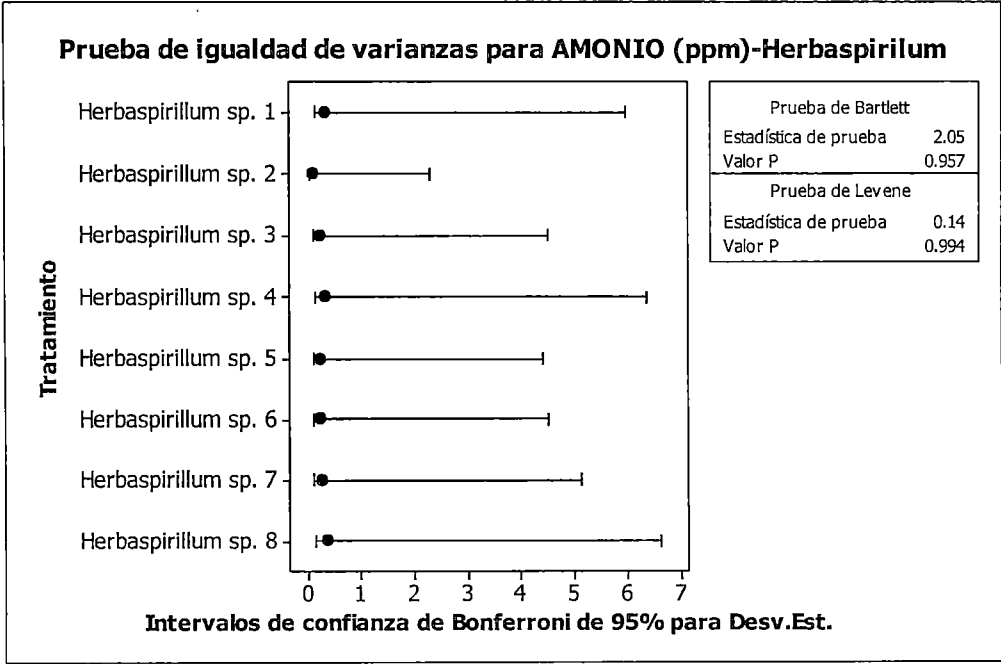
Continuación...

| Variable     | Tratamiento                | N | Medias | D.E. | Medianas | H      | p       |
|--------------|----------------------------|---|--------|------|----------|--------|---------|
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 27     | 3 | 9,04   | 0,33 | 9,22     | 178,74 | <0,0001 |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 28     | 3 | 8,90   | 0,38 | 9,09     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 29     | 3 | 8,78   | 0,32 | 8,87     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 3      | 3 | 31,49  | 0,15 | 31,48    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 30     | 3 | 8,58   | 0,38 | 8,66     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 31     | 3 | 8,39   | 0,35 | 8,42     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 32     | 3 | 8,17   | 0,26 | 8,17     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 33     | 3 | 7,44   | 0,22 | 7,51     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 34     | 3 | 7,41   | 0,20 | 7,43     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 35     | 3 | 7,15   | 0,07 | 7,12     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 36     | 3 | 6,85   | 0,03 | 6,84     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 37     | 3 | 6,56   | 0,09 | 6,57     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 38     | 3 | 6,24   | 0,13 | 6,20     |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 4      | 3 | 26,84  | 0,04 | 26,84    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 5      | 3 | 24,18  | 0,14 | 24,23    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 6      | 3 | 22,49  | 0,13 | 22,45    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 7      | 3 | 22,27  | 0,17 | 22,27    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 8      | 3 | 21,09  | 0,16 | 21,03    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>A. lipoferum</i> 9      | 3 | 20,37  | 0,06 | 20,37    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-1 | 3 | 32,68  | 0,16 | 32,63    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-2 | 3 | 32,32  | 0,04 | 32,32    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-3 | 3 | 31,84  | 0,18 | 31,83    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-4 | 3 | 30,69  | 0,07 | 30,70    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-5 | 3 | 28,48  | 0,21 | 28,50    |        |         |
| AMONIO (ppm) | <i>Azospirillum</i> sp.1-6 | 3 | 5,75   | 0,34 | 5,59     |        |         |

Prueba de de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

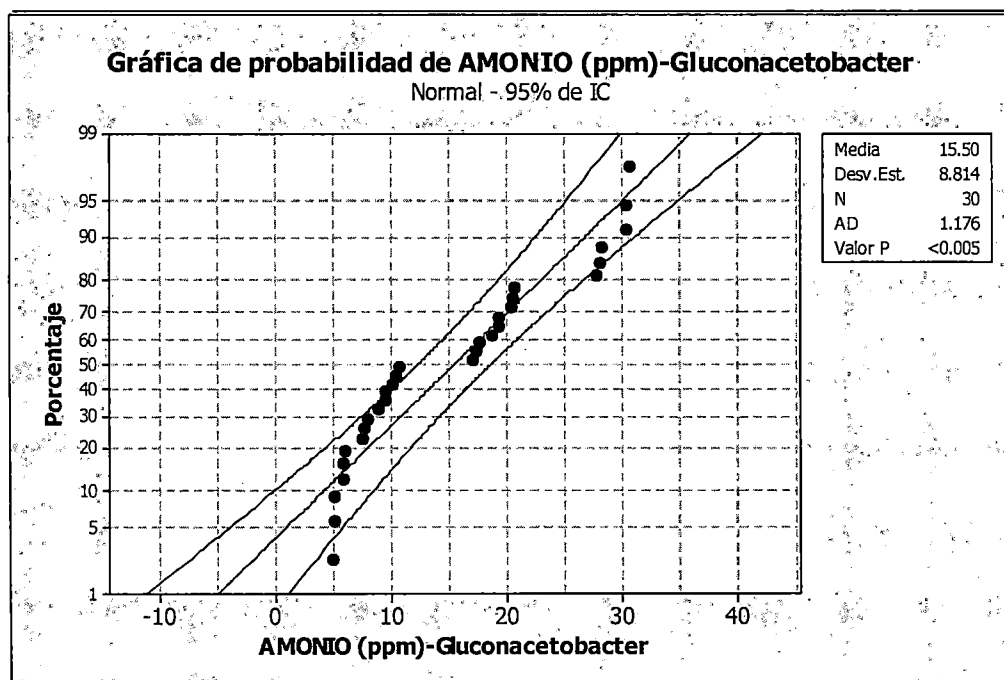


Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

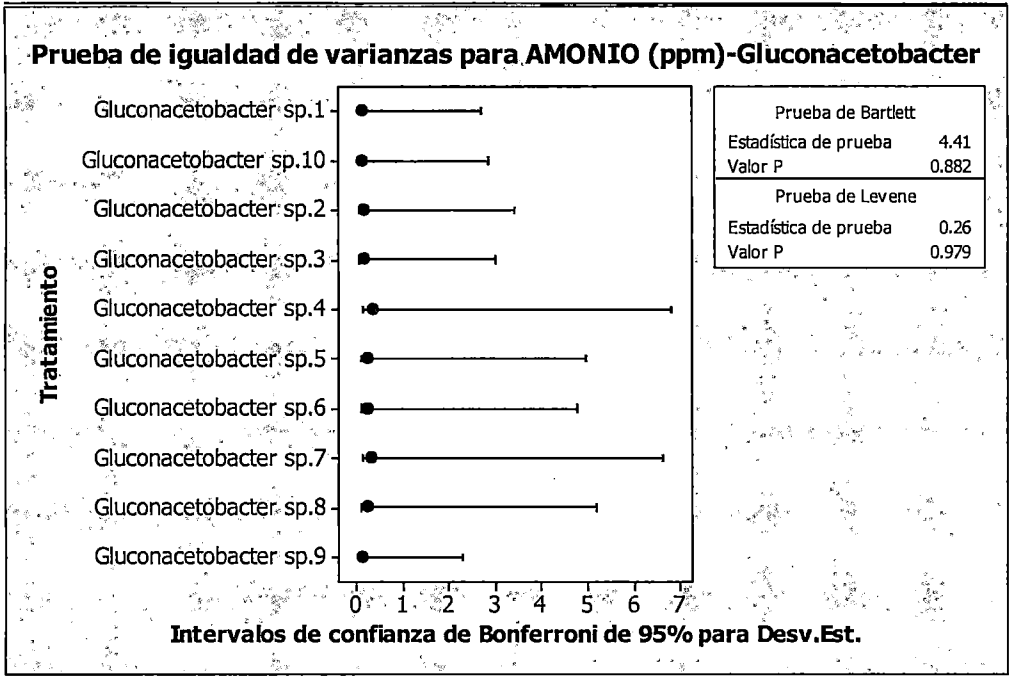


| Variable     | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H     | p      |
|--------------|-------------|---|--------|------|----------|-------|--------|
| AMONIO (ppm) | EDH 1       | 3 | 21,38  | 0,33 | 21,25    | 22,47 | 0,0021 |
| AMONIO (ppm) | EDH.2       | 3 | 19,98  | 0,13 | 19,97    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 3       | 3 | 18,41  | 0,25 | 18,46    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 4       | 3 | 17,83  | 0,36 | 17,65    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 5       | 3 | 11,92  | 0,25 | 12,03    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 6       | 3 | 11,03  | 0,25 | 11,13    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 7       | 3 | 10,12  | 0,29 | 10,26    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDH 8       | 3 | 9,61   | 0,37 | 9,68     |       |        |

Prueba de de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



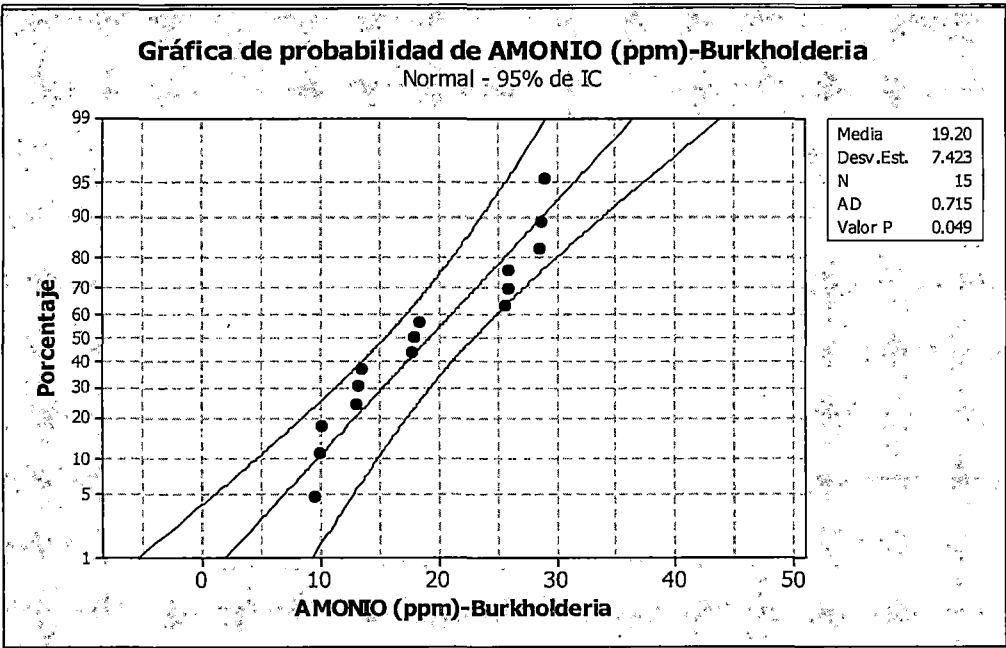
Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Gluconacetobacter* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



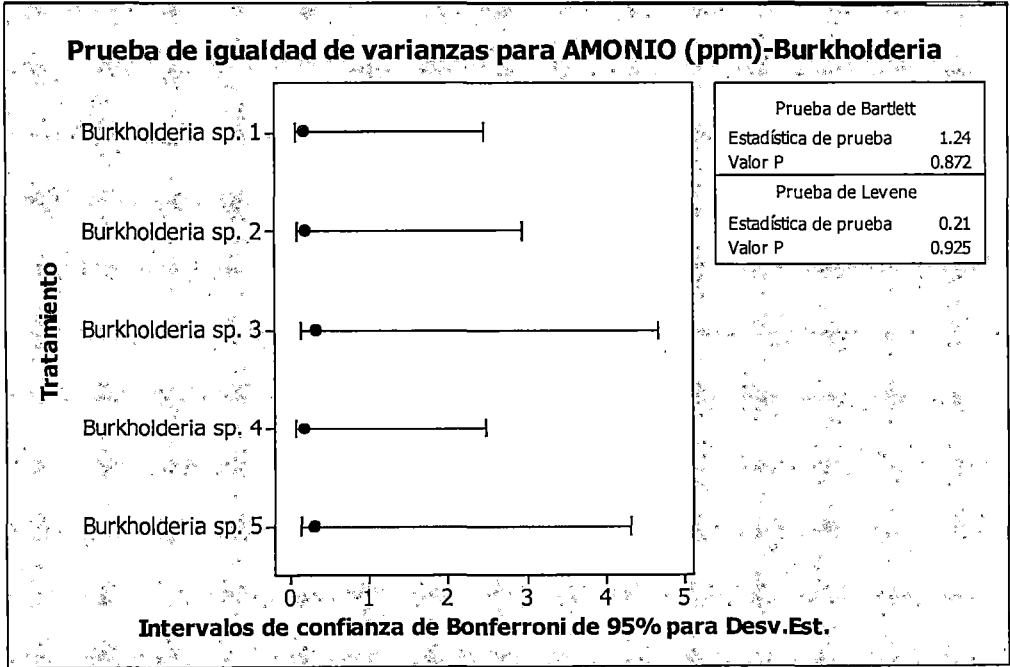
Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Gluconacetobacter* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

| Variable     | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H     | p      |
|--------------|-------------|---|--------|------|----------|-------|--------|
| AMONIO (ppm) | EDG1        | 3 | 30,57  | 0,14 | 30,52    | 28,74 | 0,0007 |
| AMONIO (ppm) | EDG2        | 3 | 28,17  | 0,17 | 28,22    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG3        | 3 | 20,69  | 0,15 | 20,65    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG4        | 3 | 19,22  | 0,34 | 19,38    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG5        | 3 | 17,46  | 0,25 | 17,43    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG6        | 3 | 10,50  | 0,24 | 10,50    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG7        | 3 | 9,41   | 0,33 | 9,56     |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG8        | 3 | 7,84   | 0,26 | 7,80     |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG9        | 3 | 6,00   | 0,12 | 5,96     |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDG10       | 3 | 5,15   | 0,14 | 5,19     |       |        |

Prueba de de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Gluconacetobacter* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014



Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

| Variable     | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H     | p      |
|--------------|-------------|---|--------|------|----------|-------|--------|
| AMONIO (ppm) | EDB1        | 3 | 28,78  | 0,17 | 28,72    | 13,50 | 0,0091 |
| AMONIO (ppm) | EDB2        | 3 | 25,83  | 0,21 | 25,93    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDB3        | 3 | 18,09  | 0,33 | 17,97    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDB4        | 3 | 13,32  | 0,18 | 13,31    |       |        |
| AMONIO (ppm) | EDB5        | 3 | 9,96   | 0,31 | 10,01    |       |        |

Prueba de de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014